

PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR IMMUNOMODULATION BASED ON PEPTIDES AND ADJUVANTS

Publication number: WO9730721

Publication date: 1997-08-28

Inventor: SCHMIDT WALTER (AT); BIRNSTIEL MAX (AT);
STEINLEIN PETER (AT); BUSCHLE MICHAEL (AT);
SCHWEIGHOFFER TAMAS (AT)

Applicant: BOEHRINGER INGELHEIM INT (DE); SCHMIDT
WALTER (AT); BIRNSTIEL MAX (AT); STEINLEIN
PETER (AT); BUSCHLE MICHAEL (AT);
SCHWEIGHOFFER TAMAS (AT)

Classification:

- international: *A61K9/06; A61K31/00; A61K38/00; A61K38/21;
A61K39/00; A61K39/02; A61K39/12; A61K39/145;
A61K39/39; A61P35/00; A61P37/00; A61P37/02;
A61K9/06; A61K31/00; A61K38/00; A61K38/21;
A61K39/00; A61K39/02; A61K39/12; A61K39/145;
A61K39/39; A61P35/00; A61P37/00; (IPC1-7):
A61K38/02; A61K38/19; A61K39/39; A61K47/00*

- European:

Application number: WO1997EP00828 19970221


















Priority number(s): DE19961007044 19960224; DE19961038313 19960919;
DE19961048687 19961125

[View INPADOC patent family](#)

[View list of citing documents](#)






[View document in the European Register](#) 

Also published as:

 EP0881906 (A1)
 US7105162 (B1)
 EP0881906 (A0)
 EE9800255 (A)
 BR9707694 (A)
 EP0881906 (B1)
 TR9801649T (T2)
 SK284582B (B6)
 RO119344 (B1)
 PL189413B (B1)
 HU224410 (B1)
 ES2225951T (T3)
 EE4481 (B1)
 CZ295396 (B6)
 CN1177610C (C)
 BG63682 (B1)
 AU722264B (B2)

[less <<](#)

Cited documents:

 GB2191494
 WO9502398
 XP000654387
 XP002033315
 XP000654445

[Report a data error here](#)

Abstract of WO9730721

The invention concerns a pharmaceutical composition containing at least one immunomodulating peptide or a protein (fragment) together with an adjuvant. The peptide is derived from a pathogen or a tumour antigen. The adjuvant has the ability to increase the binding of the peptide to the cells of the individual to be treated or increase the absorption of the peptide by the cells and intensify the immunomodulating effect of the peptide. Preferred adjuvants are basic polyamino acids, such as polyarginine or polylysine, which are optionally conjugated with a cellular ligand, for example a carbohydrate group or transferrin. The composition is used in particular as a vaccine, for example a tumour vaccine.

Description of **WO9730721**

[Translate this text](#)

PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE IMMUNMODULATION BERUHEND AUF PEPTIDEN UND ADJUVANTIEN

Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Immunmodulation.

Die Erfindung ist eine Weiterentwicklung einer therapeutischen Vakzine auf der Grundlage von Tumorzellen, die im wesentlichen auf den folgenden Voraussetzungen beruht: es bestehen qualitative oder quantitative Unterschiede zwischen Tumorzellen und normalen Zellen; das Immunsystem hat prinzipiell die Fähigkeit, diese Unterschiede zu erkennen; das Immunsystem kann - durch aktive spezifische Immunisierung mit Vakzinen dazu stimuliert werden Tumorzellen anhand dieser Unterschiede zu erkennen und deren Abstossung herbeizuführen.

Um eine Anti-Tumorantwort herbeizuführen, müssen zumindest zwei Voraussetzungen erfüllt sein: erstens müssen die Tumorzellen Antigene exprimieren, die auf normalen Zellen nicht oder nur derart begrenzt vorkommen, dass eine qualitative Unterscheidung zwischen Normal- und Tumorgewebe durch das Immunsystem möglich ist. Zweitens muss das Immunsystem entsprechend aktiviert werden, um auf diese Antigene zu reagieren. Ein wesentliches Hindernis bei der Immuntherapie von Tumoren ist deren geringe Immunogenität, vor allem im Menschen.

In jüngerer Zeit wurden Tumor-assoziierte und Tumor-spezifische Antigene entdeckt, die solche Neo-Epitope darstellen und somit potentielle Ziele für einen Angriff des Immunsystems sein sollten. Dass es dem Immunsystem dennoch nicht gelingt, Tumoren zu eliminieren, die diese Neo-Epitope exprimieren, dürfte demnach offensichtlich nicht am Fehlen von Neo Epitopen liegen sein, sondern daran, dass die immunologische Antwort auf diese Neo-Antigene unzureichend ist.

Für die Immuntherapie von Krebs auf zellulärer Basis wurden zwei allgemeine Strategien entwickelt: Einerseits die adoptive Immuntherapie, die sich der in vitro Expansion von tumorreaktiven T-Lymphozyten und deren Wiedereinführung in den Patienten bedient; andererseits die aktive Immuntherapie, welche Tumorzellen verwendet, in der Erwartung, dass damit entweder neue oder verstärkte Immunantworten gegen Tumorantigene hervorgerufen werden, die zu einer systemischen Tumorantwort führen.

Tumorstoffe auf der Grundlage der aktiven Immuntherapie wurden auf verschiedene Arten hergestellt; ein Beispiel dafür sind bestrahlte Tumorzellen, die mit immunstimulierenden Adjuvantien wie *Corynebacterium parvum* oder *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) versetzt werden, um Immunreaktionen gegen Tumorantigene hervorzurufen (Oettgen und Old, 1991).

In den letzten Jahren wurden vor allem genetisch modifizierte Tumorzellen für eine aktive Immuntherapie gegen Krebs verwendet. Eine Übersicht über diese verschiedenen Ansätze, bei denen Tumorzellen im Hinblick auf eine verstärkte Immunogenität durch Einführung verschiedener Gene verfremdet werden, wird von Zatloukal et al., 1993, gegeben. Eine der bisher eingesetzten Strategien verwendet Tumorzellen, die genetisch modifiziert werden, um Zytokine zu produzieren.

Die Identifizierung und Isolierung von Tumorantigenen und Tumorassoziierten Antigenen (TAs) bzw. davon abgeleiteter Peptide (z.B.

beschrieben von Wölfel et al., 1994 a) und 1994 b); Carrel et al., 1993, Lehmann et al., 1989, Tibbets et al., 1993, oder in den veröffentlichten internationalen Anmeldungen WO 92/20356, WO94105304, WO 94/23031, WO 95/00159 beschrieben), war die Voraussetzung für eine weitere Strategie, bei der Tumorantigene als Immunogene für Tumorstoffe verwendet werden, und zwar sowohl in Form von Proteinen als auch von Peptiden. Durch die Arbeiten von Boon et al., 1992; Boon et al.; 1994; Boon et al., 1995; van Peel et al., 1995; Van der Eynde, 1995; wurde bekannt, dass maligne Melanome Tumorantigen-abgeleitete Peptide im MHC-I-Kontext präsentieren. Mit einer Tumorstoffe in Form von Tumorantigenen als solchen wurde jedoch bisher keine ausreichende Immunogenität erreicht, um eine zelluläre Immunantwort auszulösen, wie sie zur Eliminierung von Tumorantigen tragenden Tumorzellen erforderlich wäre (Marchand et al., 1995). Um zu erreichen, dass Antigen präsentierende Zellen ("Antigen presenting cells", "APCs") definierte Peptidantigene auf ihrer Oberfläche präsentieren, wurde vorgeschlagen, die Peptide zu "pulsen", was jedoch in einer ineffizienten Beladung der Zellen mit Peptiden resultierte (Tykocinski et al., 1996); es wurde auch gezeigt, dass die co-Applikation von Adjuvantien die Immunantwort nur bedingt verstärkte (Oettgen und Old, 1991).

Eine dritte Strategie der aktiven Immuntherapie zur Steigerung der Wirksamkeit von Tumorstoffen basiert auf xenogenisierten (verfremdeten) autologen Tumorzellen. Diesem Konzept liegt die Annahme zugrunde, dass das Immunsystem auf Tumorzellen reagiert, die ein Fremdprotein exprimieren und dass im Zuge dieser Reaktion auch eine Immunantwort gegen diejenigen Tumorantigene hervorgerufen wird, die von den Tumorzellen der Vakzine präsentiert werden.

Eine zentrale Rolle bei der Regulierung der spezifischen Immunantwort spielt ein trimolekularer Komplex, bestehend aus den Komponenten T-Zell Antigenrezeptor, MHC ("Major Histocompatibility Complex")-Molekül und dessen Liganden, der ein von einem Protein abgeleitetes Peptidfragment ist.

MHC-Moleküle (bzw. die entsprechenden humanen Moleküle, die HLAs) sind Peptidrezeptoren, die bei stringenter Spezifität die Bindung zahlreicher verschiedener Liganden erlauben. Die Voraussetzung dafür stellen Allelspezifische Peptidmotive dar, die folgende Spezifitätskriterien aufweisen: Die Peptide haben, in Abhängigkeit vom MHC-Haplotyp, eine definierte Länge, beim MHC-I Haplotyp in der Regel acht bis zehn Aminosäurereste.

Typischerweise stellen zwei der Aminosäurepositionen sog. "Anker" dar, die nur durch eine einzige Aminosäure oder durch Aminosäure-Reste mit eng verwandten Seitenketten besetzt werden können. Die genaue Lage der Ankeramino-säuren im Peptid und die Anforderungen an deren Eigenschaften variieren mit den MHC-Haplotypen. Der C-Terminus der Peptid-Liganden ist häufig ein aliphatischer oder ein geladener Rest. Solche MHC-I-Peptid-Ligandenmotive sind bisher u.a. für H-2Kd, Kb, Kk, Kkm1 Db HLA-A*0201, A*0205 und B*2705 Haplotypen bekannt.

Im Rahmen des Proteinumsatzes innerhalb der Zelle werden reguläre, entartete und fremde Genprodukte, z.B. virale Proteine oder Tumorantigene, in kleine Peptide zerlegt; einige davon stellen potentielle Liganden für MHC Moleküle dar. Damit ist die Voraussetzung für deren Präsentation durch MHC-Moleküle und als Folge davon die Auslösung einer zellulären Immunantwort gegeben, wobei noch nicht im einzelnen aufgeklärt ist, wie die Peptide als MHC-Liganden in der Zelle produziert werden.

Fremde oder verfremdete Proteine und deren Bruchstücke können auch durch Immunglobuline, die die humorale Immunantwort darstellen, erkannt, gebunden und beseitigt werden. Das gilt auch für sämtliche Tumorantigene: am Beispiel der Tumor-assoziierten Antigene MUC1, CEA und HER2/neu hat man

bewiesen, dass Immunglobuline, welche für diese Proteine Spezifität aufweisen, die proteintragenden Zellen erkennen und abtöten können. Um eine Tumorantigen-spezifische humorale Immunantwort auszulösen, wurden deshalb verschiedene Formen von MUC1 und CEA als immunogene (z.B. in rekombinanten Poxvektoren; Bronte et al., J. Immunol. 154:5282 1995) in Tiermodellen und klinischen Vorversuchen erprobt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden Überlegungen weitergeführt, die bei der Entwicklung einer zellulären Tumorstoffimpfung angestellt wurden: während nicht-maligne, normale Körperzellen vom Immunsystem toleriert werden, reagiert der Körper auf eine normale Zelle, wenn sie, z.B. aufgrund einer Virusinfektion, körperfremde Proteine synthetisiert, mit einer Immunabwehr. Die Ursache dafür ist darin gelegen, dass die MHC-Moleküle Fremdpeptide präsentieren, die von den körperfremden Proteinen stammen.

Als Folge davon registriert das Immunsystem, dass etwas Unerwünschtes, Fremdes mit dieser Zelle geschehen ist. APCs (dazu zählen Makrophagen, dendritische Zellen, Langerhans-Zellen, B-Zellen sowie möglicherweise die kürzlich entdeckten biphenotypischen Zellen, die sowohl Eigenschaften von B-Zellen als auch von Makrophagen aufweisen; Tykocinski et al., 1996) werden aktiviert, eine neue, spezifische Immunität generiert und die Zelle eliminiert.

Tumorzellen enthalten zwar die jeweiligen tumorspezifischen Tumorantigene, sind aber als solche unzulängliche Stoffimpfungen, weil sie aufgrund ihrer geringen Immunogenität vom Immunsystem ignoriert werden. Beißt man nun eine Tumorzelle nicht mit einem Fremdprotein, sondern mit einem Fremdpeptid, so werden zusätzlich zu den Fremdpeptiden auch die zelleigenen Tumorantigene dieser Zelle als fremd wahrgenommen. Durch die Verfremdung mit einem Peptid kann erreicht werden, dass sich die durch die Fremdpeptide ausgelöste zelluläre Immunantwort gegen die Tumorantigene richtet.

Die Ursache für die geringe Immunogenität von Tumorzellen kann nicht nur ein qualitatives, sondern ein quantitatives Problem sein. Für ein von einem Tumorantigen abgeleitetes Peptid kann das bedeuten, dass es zwar von MHC-Molekülen präsentiert wird, jedoch in einer Konzentration, die zu gering ist, um eine zelluläre tumorspezifische Immunantwort auszulösen. Eine Erhöhung der Zahl von tumorspezifischen Peptiden auf der Tumorzelle sollte somit ebenfalls eine Verfremdung der Tumorzelle bewirken, die zur Auslösung einer zellulären Immunantwort führt. Es wurde vorgeschlagen, das Tumorantigen bzw. das davon abgeleitete Peptid dadurch auf der Zelloberfläche zu präsentieren, dass es mit einer für das betreffende Protein bzw. Peptid kodierenden DNA transfiziert wird, wie in den internationalen Veröffentlichungen WO 92/20356, WO 94/05304, WO 94/23031 und WO 95/00159, beschrieben.

In der deutschen Patentanmeldung P195 43 649.0 ist eine zelluläre Stoffimpfung offenbart, die als aktive Komponente Tumorzellen enthält, die mit einem oder mehreren Peptiden derart beladen sind, dass die Tumorzellen im Kontext mit den Peptiden vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt werden und eine zelluläre Immunantwort auslösen. Ein wesentliches Merkmal der Peptide ist, dass sie Liganden für den MHC-Haplotyp des Patienten sind. Die Peptide werden deshalb vom Immunsystem des Patienten als fremd erkannt, weil sie einerseits "Fremdpeptide" oder "Xenopeptide" sein können, d.h. sie sind verschieden von Peptiden, die abgeleitet von Proteinen sind, die von Tumorzellen des Patienten exprimiert werden. Eine andere Kategorie von Peptiden ist von Tumorantigenen abgeleitet, die von Zellen des Patienten exprimiert werden. Diese bewirken eine Steigerung der Immunogenität dadurch, dass sie in einer Konzentration auf den Tumorzellen der Stoffimpfung vorliegen, die höher ist als die Konzentration desselben Peptids auf den Tumorzellen des Patienten.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, eine neue immunmodulatorisch wirkende pharmazeutische Zusammensetzung, insbesondere eine Stoffimpfung, bereitzustellen.

In Weiterführung des Konzepts der in der deutschen Patentanmeldung P19543 649.0 geoffenbarten zellulären Vakzine wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung entwickelt, die immunmodulatorisch wirkende Peptide nicht im Kontext mit Zellen, sondern zusammen mit einem Adjuvans enthält, um eine zelluläre und/oder humorale, vorzugsweise eine systemische, Immunantwort gegen pathogene Erreger bzw. eine Anti-Tumorantwort auszulösen bzw. zu verstärken oder eine Toleranz gegen autoimmun wirkende Proteine hervorzurufen.

Es wurde überraschend festgestellt, dass bestimmte Adjuvantien, z.B.

Polykationen, von denen erstmals bereits 1965 gezeigt wurde, dass sie eine Steigerung des Transports von Proteinen in Zellen bewirken können (Ryser et al., 1965; Ryser et al., 1978; Shen et al., 1981) die Immunogenität von Peptiden steigern.

Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein oder mehrere immunmodulatorisch wirkende Peptide, Proteine oder Proteinfragmente, zusammen mit einem Adjuvans. Die Zusammensetzung ist dadurch gekennzeichnet, dass das Adjuvans die Fähigkeit aufweist, die Bindung des Peptids bzw. des Proteins oder Proteinfragments an Zellen des zu behandelnden Individuums bzw. den Eintritt in die Zellen zu steigern und eine Verstärkung der immunmodulatorischen Wirkung des Peptids bzw. des Proteins oder Proteinfragments zu bewirken.

Im folgenden werden im allgemeinen, der Einfachheit halber, Vertreter der genannten immunmodulatorisch wirkenden Peptide, Proteine oder Proteinfragmente, als "Peptide" bezeichnet. Der Begriff "Peptid" steht, wenn er sich nicht ausdrücklich auf den Liganden bezieht, auch stellvertretend für grössere Proteinfragmente oder Proteine, von denen das Peptid abgeleitet ist bzw. einzelluläres Abbauprodukt darstellt.

Unter "immunmodulatorischer Wirkung" wird einerseits die Auslösung oder Verstärkung einer zellulären und/oder humoralen, vorzugsweise systemischen Immunreaktion verstanden. In dieser Ausführungsform wirkt die erfindungsgemässe pharmazeutische Zusammensetzung als Vakzine.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Peptide Liganden für mindestens ein MHC-Molekül, das vom zu behandelnden Individuum exprimiert wird.

Die humanen MHC-Moleküle werden, gemäss den internationalen Gepflogenheiten, im folgenden auch als "HLA" ("Human Leucocyte Antigen") bezeichnet.

Unter "zelluläre Immunantwort" ist vor allem die zytotoxische T-Zellimmunität zu verstehen, die als Folge der Generierung von zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen und CD4-positiven Helfer-T-Zellen die Zerstörung der Tumorzellen oder der vom pathogenen Erreger befallenen Zellen bewirkt.

Unter "humorale Immunantwort" ist die Produktion von Immunglobulinen zu verstehen, die selektiv Tumorzellen oder von pathogenen Erregern abgeleitete Strukturen erkennen und in der Folge zusammen mit anderen Systemen, wie z.B. Komplement, ADCC (Antibody dependent Cytotoxicity) oder Phagozytose, die Zerstörung dieser Tumorzellen bzw. der pathogenen Erreger oder der davon befallenen Zellen bewirken.

Das in der Vakzine enthaltene Peptid ist abgeleitet von einem Antigen bzw.

stellt im Fall von Proteinen ein Antigen dar, gegen das eine zelluläre und/oder humorale Immunantwort ausgelöst werden soll. Damit wird bewirkt, dass T-Zellen bzw. andere zytotoxische Effektorzellen, die den Krankheitserreger bzw. die Tumorzellen, die das Antigen aufweisen, erkennen, und/oder Antikörper

generiert werden.

Für die Immunisierung gegen Krankheitserreger, wie Bakterien, Viren, Parasiten, werden Proteine bzw. Peptide verwendet, die ein Protein des bzw.

der jeweiligen Erreger darstellen bzw. davon abgeleitet sind. Geeignet sind dabei vor allem Proteine, die von der hohen allgemeinen Mutationsrate dieser Erreger verschont bleiben. Publiizierte Beispiele sind HPV16/17 (Human Papilloma Virus; Feltkamp et al., 1995), Hepatitis B Virus Core Antigen (Vitiello et al., 1995), Plasmodium Bergheii (Widmann et al., 1992.), Influenzavirus-Nukleoprotein, Hepatitis C Virus.

In einer Ausführungsform der Erfindung ist das Protein, im Hinblick auf die Auslösung einer Anti-Tumorantwort, ein Tumorantigen bzw. das Peptid von einem Tumorantigen abgeleitet, dabei wird die pharmazeutische Zusammensetzung als Tumorstoff verwendet. In diesem Fall ist, bei therapeutischer Anwendung der Stoff, das Peptid von einem Tumorantigen abgeleitet, das von den Tumorzellen des Patienten exprimiert wird. Diese Tumorantigene sind z.B. solche, die vom Patienten in einer Konzentration exprimiert werden, die zu gering ist, so dass die Tumorzellen nicht als fremd erkannt werden.

Die Tumorantigene des Patienten können im Zuge der Erstellung von Diagnose und Therapieplan mit Standardmethoden bestimmt werden: Tumorantigene können auf einfache Weise immunhistochemisch mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Wenn die Tumorantigene Enzyme sind, z.B. Tyrosinasen, können sie mit Enzymassays nachgewiesen werden.

Bei Tumorantigenen mit bekannter Sequenz kann die RT-PCR-Methode herangezogen werden (Boon, T., et al., 1994; Coulie, P.G., et al., 1994; Weynants, P., et al., 1994). Weitere Nachweismethoden sind Assays auf der Grundlage von CTLs mit Spezifität für das zu bestimmende Tumorantigen.

Derartige Assays wurden u.a. von Herin et al., 1987; Coulie et al., 1993; Cox et al., 1994; Rivoltini et al., 1995; Kawakami et al., 1995; sowie in der WO 94/14459 beschrieben; diesen Literaturstellen sind auch verschiedene Tumorantigene bzw. davon abgeleitete Peptidepitope entnehmbar, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind; Beispiele für geeignete Tumorantigene sind ferner in den kürzlich erschienenen Übersichtsartikeln von Rosenberg, 1996, und Henderson und Finn, 1996, angegeben.

Bezüglich der verwendbaren Tumorantigene unterliegt die vorliegende Erfindung keiner Beschränkung; einige Beispiele für bekannte, im Rahmen der Erfindung verwendbare Tumorantigene bzw. davon abgeleitete Peptide sind in der Tabelle angegeben.

Eine Tumorstoff, die ein Tumorantigen bzw. von einem Tumorantigen abgeleitete Peptide enthält, kann, ausser therapeutisch, auch prophylaktisch verabreicht werden. Bei der prophylaktischen Anwendung wird zweckmässig eine Mischung von Peptiden eingesetzt, die abgeleitet sind von Vertretern häufig auftretender Tumorantigene. Bei der therapeutischen Anwendung der erfindungsgemässen Tumorstoff werden ein oder mehrere Peptide verwendet, von denen zu erwarten ist, dass sie in Tumorantigen(en) des Patienten enthalten sind.

Die erfindungsgemässe Tumorstoff hat gegenüber einer zellulären Stoff auf der Grundlage autologer Tumorzellen den Vorteil, dass sie auch für Patienten in einem relativ frühen Stadium (Stadium I und II) der Erkrankung von therapeutischem Nutzen ist, von denen nicht ausreichend Tumorzellen für die Herstellung einer zellulären Stoff zur Verfügung stehen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das Peptid, im Hinblick auf die Auslösung einer zellulären Immunantwort, auf den MHC-I- oder MHC-II-Subtyp des zu vakzinierenden Individuums abgestimmt; das Peptid weist also eine Sequenz auf bzw. enthält eine Sequenz, die seine Bindung an ein

MHC-Molekül gewährleistet.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die pharmazeutische Zusammensetzung, in der Anwendungsform als Tumorstoff, ausserdem ein immunstimulatorisch wirkendes Polypeptid, insbesondere ein Zytokin. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird als Zytokin Interleukin 2(IL-2) oder GM-CSF verwendet, z.B. in einer Dosierung von ca. 1000 Einheiten; weitere Beispiele für Zytokine sind IL-4, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , TNF- α , sowie Kombinationen davon, z.B. IL-2 + IFN- γ , IL-2 + IL-4, IL-2 + TNF- α oder TNF- α + IFN- γ .

In einer Ausführungsform der Erfindung dient die pharmazeutische Zusammensetzung dazu, eine Toleranz gegen Proteine bzw. deren Fragmente herbeizuführen, die autoimmun induzierte Erkrankungen auslösen, also zur Therapie von Autoimmunerkrankungen. Die in dieser Ausführungsform der Erfindung verwendeten Peptide sind von Proteinen abgeleitet, die Autoimmunerkrankungen verursachen.

Im Gegensatz zu der Anwendung der Erfindung als Tumorstoff oder als Stoff gegen pathogene Erreger, bei der die Peptide mit einem Abschnitt des Ursprungproteins (Tumorantigen bzw. Protein des Pathogens) im wesentlichen derart übereinstimmen, dass das Peptid als das "Original Antigen" erkannt wird, werden bei der Anwendung der Erfindung zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen u.a. Peptide verwendet, die zur Aminosäuresequenz des Ursprungproteins kritische Unterschiede aufweisen.

Diese Peptide binden zwar aufgrund ihrer Ankerpositionen an das MHC Molekül, weisen jedoch in ihrer Sequenz Mutationen auf, die bewirken, dass diese Peptide als Antagonisten funktionieren, welche die aktivierten, spezifischen T-Zellen wieder abschalten (Kersh und Allen, 1996).

Als Peptid-Antagonisten eignen sich sowohl "natürliche" Antagonisten, die in Viren entdeckt wurden (Bertoletti et al., 1994), als auch Antagonisten, die durch systematische Forschung, z.B. durch Screenen von Peptid-Libraries, gefunden wurden. Ein Beispiel für Peptid-Antagonisten sind Peptide, die T-Zellen ausschalten können, welche spezifisch für Myelin Basic Protein sind, diese wurden in Tierexperimenten auf ihre Wirksamkeit erprobt. (Brocke et al., 1996).

Ein Peptid, das eine zelluläre Immunantwort auslösen soll, muss an ein MHC Molekül binden können. Damit die Immunantwort im Patienten ausgelöst wird, muss somit das zu behandelnde Individuum ein entsprechendes HLA Molekül in seinem Repertoire aufweisen. Die Bestimmung des HLA-Subtyps des Patienten stellt somit, im Hinblick auf die Auslösung einer zellulären Immunantwort, eine der wesentlichen Voraussetzungen für die wirksame Anwendung eines Peptids an diesem Patienten dar.

Der HLA-Subtyp des Patienten kann mit Standardmethoden, wie dem Mikro Lymphotoxizitätstest bestimmt werden (Practical Immunology., 1989). Dieser Test beruht auf dem Prinzip, aus Patientenblut isolierte Lymphozyten zunächst mit Antiserum oder einem monoklonalen Antikörper gegen ein bestimmtes HLA-Molekül in Gegenwart von Kaninchen-Komplement (C) zu versetzen. Positive Zellen werden lysiert und nehmen einen Indikator Farbstoff auf, während unbeschädigte Zellen ungefärbt bleiben.

Zur Bestimmung des HLA-I- oder HLA-II-Haplotyps eines Patienten kann auch die RT-PCR ("Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction") herangezogen werden (Curr. Prot. Mol. Biol. Kapitel 2 und 15). Dazu entnimmt man einem Patienten Blut und isoliert daraus RNA. Diese RNA unterwirft man zunächst einer Reversen Transkription, wodurch cDNA des Patienten entsteht. Die cDNA dient als Matrize für die Polymerasekettenreaktion mit Primerpaaren, die spezifisch die Amplifikation eines DNA-Fragmentes bewirken, das für einen bestimmten HLA-Haplotyp steht. Erscheint nach Agarosegelelektrophorese eine DNA-Bande, exprimiert der Patient das entsprechende HLA-Molekül. Erscheint die Bande nicht, ist der Patient dafür negativ.

Die Definition eines erfindungsgemäss verwendeten Peptids durch ein HLA Molekül bestimmt dieses hinsichtlich seiner Ankeramino-säuren und seiner Länge; definierte Ankerpositionen und Länge gewährleisten, dass ein Peptid in die Peptid-Bindungsfurche des jeweiligen HLA-Moleküls des Patienten passt. Dies hat zur Folge, dass das Immunsystem stimuliert wird und eine zelluläre Immunreaktion erzeugt wird, die sich, im Falle der Verwendung eines von einem Tumorantigen abgeleiteten Peptids, gegen die Tumorzellen des Patienten richtet.

Peptide, die zur Anwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind in einer grossen Bandbreite verfügbar. Ihre Sequenz kann von natürlich vorkommenden immunogenen Proteinen bzw. deren zellulären Abbauprodukten, z.B. von viralen oder bakteriellen Peptiden, von Tumorantigenen, abgeleitet sein, oder sie können Antagonisten zu Peptiden sein, die von Autoimmunerkrankungen induzierenden Proteinen abgeleitet sind.

Geeignete Peptide können z.B. auf der Grundlage von literaturbekannten Peptidsequenzen ausgewählt werden.

Im Hinblick auf die Auslösung einer zellulären Immunantwort können die Peptide z.B. anhand der von Rammensee et. al., 1993, Rammensee et al., 1995, Falk et al., 1991, für die unterschiedlichen HLA-Motive beschriebenen, von immunogenen Proteinen verschiedenen Ursprungs abgeleiteten Peptide definiert werden, die in die Bindungsfurchen der Moleküle der jeweiligen HLA-Subtypen passen.

Für Peptide, die eine Teilsequenz eines Proteins mit immunogener Wirkung aufweisen, kann anhand der bereits bekannten oder gegebenenfalls noch zu bestimmenden Polypeptidsequenzen durch Sequenzabgleich unter Berücksichtigung der HLA-spezifischen Anforderungen festgestellt werden, welche Peptide geeignete Kandidaten darstellen. Beispiele für geeignete Peptide finden sich z.B. bei Rammensee et al., 1993, Falk et al., 1991, und Rammensee, 1995; sowie in der WO 91/09869 (HIV-Peptid); von Tumorantigenen abgeleitete Peptide wurden u.a. in den veröffentlichten internationalen Patentanmeldungen WO 95100159, WO 94/05304 beschrieben. Auf die Offenbarung dieser Literaturstellen und der darin im Zusammenhang mit Peptiden zitierten Artikel wird beispielhaft Bezug genommen. Zu bevorzugten Kandidaten zählen Peptide, deren Immunogenität bereits gezeigt wurde, also Peptide, die von bekannten Immunogenen, z.B. viralen oder bakteriellen Proteinen, abgeleitet sind.

Statt die Originalpeptide zu verwenden, die in die Bindungsfurche von MHC-I oder MHC-II-Molekülen passen, also Peptide, die unverändert von natürlichen Proteinen abgeleitet sind, können anhand der auf der Grundlage der Originalpeptidsequenz angegebenen Minimalanforderungen bezüglich Ankerpositionen und Länge Variationen vorgenommen werden, sofern durch diese Variationen die effektive Immunogenität des Peptids, die sich zusammensetzt aus seiner Bindungsaffinität an das MHC-Molekül und seiner Fähigkeit, T-Zell-Rezeptoren zu stimulieren, nicht nur nicht beeinträchtigt ist, sondern vorzugsweise verstärkt wird. In diesem Fall werden also erfindungsgemäss künstliche Peptide verwendet, die entsprechend den Anforderungen der Bindungsfähigkeit an ein MHC-Molekül entworfen sind.

So können z.B. ausgehend vom H2-Kd-Liganden Leu Phe Glu AlaIle Glu Gly PheIle (LFEAIEGFI) die Aminosäuren, die keine Ankeramino-säuren darstellen, geändert werden, um das Peptid der Sequenz Phe PheIle Giy Ala Leu Glu GluIle (FFIGALEEI) zu erhalten; ausserdem kann die Ankeramino-säureIle an Position 9 durch Leu ersetzt werden. Die Bestimmung von Epitopen von MHC-I- bzw. MHC-II-Liganden bzw. deren Variation kann z.B. nach dem von Rammensee et al., 1995, beschriebenen Prinzip vorgenommen werden. Die Länge des Peptids entspricht im Falle seiner Abstimmung auf MHC-I Moleküle vorzugsweise einer Minimalsequenz von 8 bis 10 Aminosäuren mit den erforderlichen Ankeramino-säuren. Das MHC-II-Bindungsmotiv, das sich über neuen Aminosäuren erstreckt, weist einen höheren Grad an Degeneration in den Ankerpositionen auf. Es wurden kürzlich, ausgehend von der Röntgenstrukturanalyse von MHC-II-Molekülen, Methoden entwickelt, die die genaue Analyse

der MHC-II-Bindungsmotive, und ausgehend davon, Variationen der Peptidsequenz erlauben (Rammensee et al., 1995, und die dort zitierte Originalliteratur).

Gegebenenfalls kann das Peptid auch am C- und/oder am N-Terminus verlängert sein, sofern diese Verlängerung die Bindungsfähigkeit an das MHC-Molekül nicht beeinträchtigt bzw. das verlängerte Peptid auf die Minimalsequenz zellulär prozessiert werden kann.

In einer Ausführungsform der Erfindung ist das Peptid negativ geladen. In dieser Ausführungsform kann das Peptid mit negativ geladenen Aminosäuren verlängert werden, oder es können negativ geladene Aminosäuren in das Peptid, vorzugsweise an Positionen, die für die Erkennung durch spezifische CTLs oder als Ankeramino-säuren nicht erforderlich sind, eingebaut werden, um eine elektrostatische Bindung des Peptids an ein polykationisches Adjuvans, wie Polylysin, zu erreichen.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird das Antigen nicht in Form eines Peptids, sondern als Protein oder Proteinfragment bzw. als Gemisch von Proteinen oder Proteinfragmenten eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind grössere Proteinfragmente bzw. ganze Proteine geeignet, von denen gewährleistet ist, dass sie nach der Applikation von den APCs des Patienten zu Peptiden prozessiert werden, die an das MHC-Molekül passen.

Das Protein stellt ein Antigen bzw. Tumorantigen dar, von dem die nach Prozessierung erhaltenen Bruchstücke abgeleitet sind. In dieser Ausführungsform dient das Adjuvans dazu, die Beladung ("Transloading") von Zellen, insbesondere APCs wie dendritischen Zellen oder Makrophagen, mit dem Tumorantigen bzw. den Fragmenten zu ermöglichen oder zu verstärken. So aufgenommene Proteine bzw. Proteinfragmente werden von den Zellen prozessiert und können danach im MHC-Kontext den Immuneffektorzellen präsentiert werden und somit eine Immunantwort auslösen bzw. verstärken (Braciale und Braciale, 1991; Kovacs Bankowski und Rock, 1995; York und Rock, 1996).

Die Ausführungsform der Erfindung, in der Proteine bzw. grössere Proteinfragmente als Antigene eingesetzt werden, hat den Vorteil, dass eine geringere Abhängigkeit vom HLA-Typ des Patienten besteht, weil das Protein in mehrere Bruchstücke prozessiert wird und somit eine grössere Variabilität hinsichtlich der "Passform" der Peptide gegeben ist.

Im Fall der Verabreichung von Proteinen oder Proteinfragmenten kann man die Identität der prozessierten Endprodukte mittels chemischer Analyse (Edman-Abbau oder Massenspektrometrie von prozessierten Fragmenten; vgl. den Übersichtsartikel von Rammensee et al., 1995 sowie die darin zitierte Originalliteratur) oder biologischen Assays (Fähigkeit der APCs zur Stimulation von Zellen, die für die prozessierten Fragmente spezifisch sind), nachweisen.

Die Auswahl von Peptid-Kandidaten, die geeignet sind, eine zelluläre Immunantwort auszulösen, erfolgt prinzipiell in mehreren Stufen: Im allgemeinen werden die Kandidaten, zweckmässig in Serienversuchen, zunächst in einem Peptid-Bindungstest auf ihre Bindungsfähigkeit an ein MHC-Molekül getestet.

Eine dafür geeignete Untersuchungsmethode beruht auf der Fähigkeit von Peptiden, leere MHC-Moleküle stabilisieren zu können, wie z.B. von Stuber et al., 1994, und McIntyre et al., 1996, beschrieben. Dabei wird das Peptid auf Zellen aufgebracht, die in der Lage sind, das jeweilige MHC-Molekül zu exprimieren, aber wegen eines genetischen Defekts keine endogenen Peptide im MHC-Kontext binden. Geeignete Zelllinien dieses Typs sind RMA S (Maus) und T2 (human), bzw. deren transfizierte Varianten. Es sind dann nur die vom jeweiligen Peptid stabilisierten MHC-Moleküle nachweisbar, vorzugsweise mittels der auf Durchflusszytometrie beruhenden FACS-Analyse (Flow Cytometry, 1989; FACS Vantage TM User's Guide, 1994; CELL Quest TM User's Guide, 1994). Stabile MHC-Moleküle werden mit einem geeigneten anti-MHC-Antikörper und mit einem mit Fluoreszenzfarbstoff, z.B.

FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markierten zweiten (z.B. polyklonalen) Antikörper nachgewiesen. Im Durchfluss werden dann einzelne Zellen von einem Laser einer bestimmten Wellenlänge angeregt; die emittierte Fluoreszenz wird gemessen, sie ist abhängig von der an die Zelle gebundenen Peptidmenge.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der gebundenen Peptidmenge ist der Scatchard-Plot, wie beschrieben von Sette et al., 1994. Man benutzt dazu das Peptid, das z.B. mit ¹²⁵I markiert ist, und inkubiert es über Nacht mit isolierten oder rekombinant hergestellten MHC-Molekülen bei 4°C mit verschiedenen definierten Konzentrationen von Peptid. Zur Bestimmung unspezifischer Wechselwirkung des Peptids wird zu einigen Proben ein Überschuss nicht-markierten Peptids zugesetzt, der die unspezifische Interaktion des markierten Peptids unterbindet. Anschliessend entfernt man das unspezifisch gebundene Peptid, z.B. mittels Gelchromatographie. Die Menge des gebundenen Peptids wird nun in einem Szintillationszähler anhand der emittierten Radioaktivität ermittelt. Die Auswertung der so gewonnenen Daten erfolgt nach Standardmethoden.

Eine Übersicht über Methoden zur Charakterisierung der MHC/Peptid Wechselwirkung, der Analyse von MHC-Liganden und Peptid-Bindungs Assays, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, wurde von Rammensee et al., 1995, gegeben.

In einem nächsten Schritt werden Peptid-Kandidaten mit guten Bindungsqualitäten auf ihre Immunogenität geprüft: Die Auslösung einer zellulären Immunantwort kann durch den Nachweis peptidspezifischer CTLs bestätigt werden, z.B. mittels der in Current Protocols in Immunology, Kapitel 3, oder von Blomberg et al., 1993, beschriebenen Methode. Ein weiterer Nachweis für das Vorliegen einer zellulären Immunantwort ist dann gegeben, wenn in Abwesenheit von T-Zellen in einem Versuchstier (welche dadurch erzielt wird, dass man das Tier mit Antikörpern behandelt, die CD4- oder CD8-Zellen depletieren) keine Immunantwort auftritt (Current Protocols in Immunology, Kapitel 3).

Eine zelluläre Immunantwort kann auch durch den Nachweis einer "delayed- type hypersensitivity" (DTH)-Reaktion in immunisierten Tieren gezeigt werden. Hierzu können Peptide in die Fusssohle von Mäusen injiziert werden, worauf die Anschwellung der injizierten Stelle gemessen wird (Grohman et al., 1995; Puccetti et al., 1994).

Die Induktion einer humoralen Immunantwort durch Peptide, die Fremdanigene für den Organismus sind bzw. Antigene, die vom zu behandelnden Organismus in geringer Konzentration exprimiert werden, kann durch Nachweis von spezifischen Antikörpern im Serum bestimmt werden. Eine geeignete Methode zur Antikörpertiterbestimmung im Serum ist der Enzyme Linked Immunoassay (ELISA). Dabei werden die spezifischen Antikörper nach Bindung an das zur Immunisierung verwendeten Peptids mit einer Farbreaktion nachgewiesen. Eine alternative Methode ist der Western Blot. Hierbei binden spezifische Serumantikörper an das auf einer Membran immobilisierte Peptid. Gebundene Antikörper werden schliesslich wiederum mit einer Farbreaktion nachgewiesen (Referenz für beide Methoden: Current Protocols in Immunology. Editors: Coligan et al., 1991,).

Vor allem nach der Vakzinierung mit Fremdanigenen, z.B. viralen Ursprungs, ist eine Bildung von Antikörpern zu erwarten. Es ist aber auch nicht auszuschliessen, dass spezifische Antikörper auch gegen mutierte oder überexprimierte Peptide, die von zellulären Tumoranigenen abgeleitet sind, gebildet werden. Eine Tumorerstörung durch solche Antikörper könnte nach Antikörperbindung an Tumorzellen durch andere Komponenten des Immunsystems, wie z.B. Komplement, Antikörper abhängige Zytotoxizität (ADCC) oder Phagozytose durch Makrophagen erfolgen (Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K. Immunology, Churchill Livingstone).

Die Auslösung einer zellulären Immunantwort durch Peptide, die abgeleitet sind von Proteinen, deren

immunogene Wirkung nicht bekannt ist, kann z.B.

getestet werden, wie von Rivoltini et al. 1995, oder Kawakami et al., 1994a, beschrieben. Dazu benötigt man T-Zellen, die das gewünschte Peptid erkennen können, wenn es von MHC-Molekülen präsentiert wird. Im Fall von Peptiden, die von Tumorzellen herrühren, gewinnt man die entsprechenden T-Zellen aus den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs), wie von Kawakami et al. 1994b beschrieben; im Fall von Fremdpeptiden gewinnt man solche T-Zellen analog aus dem peripheren Blut. Die T-Zellen werden mit Zelllinien wie T2 (Alexander et al., 1989) oder RMA-S (Kärre et al., 1986), die mit dem jeweiligen Peptid versetzt worden sind, inkubiert und lysieren diese, falls es sich um ein immunogenes Peptid handelt.

Eine weitere Möglichkeit für die Testung von MHC-bindenden Peptidkandidaten auf ihre Immunogenität besteht darin, die Bindung der Peptide an T2-Zellen zu untersuchen. Ein solcher Test beruht auf der Eigenart von T2-Zellen (Alexander et al., 1989) oder RMA-S-Zellen (Kärre et al., 1986), defekt im TAP-Peptid-Transportmechanismus zu sein und erst dann stabil MHC-Moleküle zu präsentieren, wenn man auf sie Peptide aufbringt, die im MHC-Kontext präsentiert werden. Für den Test werden z.B.

T2-Zellen oder RMA-S-Zellen verwendet, die stabil mit einem HLA-Gen, z.B.

mit HLA-A1- und/oder HLA-A2-Genen transfiziert sind. Werden die Zellen mit Peptiden versetzt, die gute HLA-Liganden sind, indem sie im HLA-Kontext so präsentiert werden, dass sie vom Immunsystem als fremd erkannt werden können, bewirken solche Peptide, dass die HLA-Moleküle in signifikanter Menge auf der Zelloberfläche aufscheinen. Der Nachweis der HLAs auf der Zelloberfläche, z.B. mittels monoklonaler Antikörper, erlaubt die Identifizierung geeigneter Peptide (Malnati et al., 1995; Sykulev et al., 1994).

Auch hier wird zweckmässig ein Standardpeptid mit bekannt guter HLA Bindungsfähigkeit verwendet.

Im Hinblick auf eine möglichst breite Anwendbarkeit der erfindungsgemässen pharmazeutischen Zusammensetzung wird zweckmässig eine Mischung mehrerer Peptide verwendet, von denen jedes an ein anderes MHC-Molekül binden kann, vorzugsweise an einen von zwei oder drei der am häufigsten vertretenen MHC-Subtypen. Mit einer Vakzine auf der Grundlage einer Mischung von Peptiden, die an diese Haplotypen binden können, kann eine breite Patientenpopulation erfasst werden.

In einer Ausführungsform der Erfindung kann die Vakzine mehrere Peptide Sequenz aufweisen. Die verwendeten Peptide können sich in diesem Fall einerseits dadurch unterscheiden, dass sie an unterschiedliche HLA-Subtypen binden. Damit kann erreicht werden, dass mehrere bzw. sämtliche HLA Subtypen eines Patienten oder einer grösseren Gruppe von Patienten erfasst werden.

Eine weitere, gegebenenfalls zusätzliche, Variabilität hinsichtlich der verwendeten Peptide kann darin bestehen, dass Peptide, die an einen bestimmten HLA-Subtyp binden, sich hinsichtlich ihrer nicht für die HLA Bindung massgeblichen Sequenz unterscheiden, indem sie z.B. von unterschiedlichen Proteinen desselben pathogenen Erregers oder von verschiedenen Erregern abgeleitet sind. Von einer solchen Variabilität kann eine Verstärkung der Stimulierung der Immunantwort bzw. eine Immunisierung gegen verschiedene Erreger erreicht werden.

Die Menge an wirksamem Peptid in der erfindungsgemässen Zusammensetzung kann über einen breiten Bereich variieren. Die Menge an Peptid hängt u.a. von der Verabreichungsart und der jeweiligen Formulierung ab. Die zu verabreichende Menge an Peptid kann ca. 1.0pg bis ca. 5000pg pro Dosis betragen, im allgemeinen 1.0ug bis ca. 1000pg, insbesondere ca.

10ijg bis ca. 500pg. Die Verabreichung kann ein- oder mehrmals erfolgen, bei mehrmaliger Verabreichung

zweckmässig mindestens dreimal.

Insbesondere bei der therapeutischen Anwendung kann eine Applikation in Intervallen (z.B. vonlx pro Woche bislx pro Monat) über einen beliebig langen Zeitraum erfolgen, der durch den spezifischen Immunstatus des Patienten bzw. den Krankheitsverlauf bedingt ist.

Die erfindungsgemässe pharmazeutische Zusammensetzung kann auch ex vivo angewendet werden: Das Prinzip einer möglichen ex vivo Anwendung besteht darin, APCs, z.B. dendritische Zellen, ex vivo zu kultivieren, die Zellkultur mit der erfindungsgemässen Zusammensetzung zu inkubieren und die APCs, die nun das Peptid im MHC-Kontext präsentieren, dem zu behandelnden Individuum zu verabreichen. Für diese Anwendungsmöglichkeit können literaturbekannte Methoden verwendet werden, wie z.B. von Porgador und Gilboa, 1995; Young und Inaba, 1996, beschrieben.

Das in der erfindungsgemässen Zusammensetzung enthaltene Adjuvans hat die Eigenschaft, den Eintritt des Peptids in die Zellen bzw. die Bindung des Peptides an die Zellen des Patienten zu erleichtern und die Immunogenität des Peptids zu verstärken. Das Adjuvans kann z.B. die Membranen von Zielzellen, in die das Peptid gelangen soll, zumindest kurzfristig durchlässig machen, um auf diese Weise das Peptid in die Zelle zu befördern. Dafür dürfte es von Vorteil, aber nicht unbedingt erforderlich sein, dass das Peptid an das Adjuvans gebunden wird, z.B. über elektrostatische Wechselwirkung zwischen elektronegativem Peptid und polykationischem Adjuvans. Es kann ein Import des Peptids in die Zelle auch dadurch bewirkt werden, dass das Peptid aufgrund seiner räumlichen Nähe zur Zellmembran durch diese hindurch gelangen kann, sobald das Adjuvans deren Durchlässigkeit bewirkt hat. Die Wirkung des Adjuvans kann auch darauf beruhen, dass es die für die Aufnahme in die Zelle kritische Konzentration des Peptids an der Zelloberfläche erhöht oder dass es die Phagozytose oder den Flüssigtransport (Pinozytose) des Peptids in die Zelle bewerkstelligt.

Überraschenderweise verstärkt die Gegenwart des Adjuvans nicht nur die Aufnahme des Peptids in die Zelle, sondern resultiert auch in einer Verstärkung der immunmodulatorischen Wirkung des Peptids, die auf eine korrekte Präsentation des Peptids durch MHC-Moleküle zurückzuführen sein dürfte.

In einer Ausführungsform können Adjuvantien u.a. grundsätzlich alle diejenigen Membran-permeabilisierenden Substanzen sein, die für den Transport von Nukleinsäuren in die Zelle verwendet werden; in diesem Zusammenhang wird beispielhaft auf die Offenbarung der WO 93/19768 Bezug genommen, wo derartige Substanzen genannt sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Adjuvans eine basische Polyaminosäure oder eine Mischung basischer Polyaminosäuren.

Der Polymerisationsgrad der Polyaminosäuren kann über einen weiten Bereich variieren. Er beträgt ca. 5 bis ca. 1000, insbesondere ca. 15 bis ca.

500.

Bevorzugt wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Adjuvans Polyarginin verwendet.

Ein weiteres im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugtes Adjuvans ist Polylysin.

Beispiele für weitere geeignete, insbesondere polykationische, organische Verbindungen (basische Polyaminosäuren) sind Polyornithin, Histone, Protamine, Polyethylenimine, oder Mischungen davon.

Das Adjuvans ist gegebenenfalls konjugiert mit einem zellulären Liganden, z.B. mit Transferrin, gp120,

LDL (Low Density Lipoprotein), α -Fetuin, EGF (Epidermal Growth Factor)-Peptiden oder mit einem Vertreter anderer zellulärer Liganden, die für den Transport von DNA mittels Rezeptorvermittelter Endozytose in der WO 93/07283 beschrieben sind, Kohlenhydratresten, wie Mannose oder Fucose (Liganden für Makrophagen) oder Antikörper(fragmente)n gegen Zelloberflächenproteine Gegebenenfalls liegen polykationische Adjuvantien, wie Polyarginin oder Polylysin, die gegebenenfalls konjugiert sind mit einem zellulären Liganden, als Bestandteil eines Komplexes mit DNA vor, z.B. in Form von Plasmid DNA.

Die DNA kann frei sein von Sequenzen, die für funktionelle Proteine kodieren, in diesem Fall ist die DNA ein Leerplasmid.

In einer Ausführungsform der Erfindung enthält die DNA Sequenzen, die für immunmodulatorische Proteine, insbesondere Zytokine wie IL-2, Interferone, GM-CSF, kodieren.

Um den Mechanismus des durch basische Polyaminosäuren vermittelten Peptidtransports zu untersuchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) gemessen.

Während in Polyarginin-behandelten Proben die Konzentrationen an freigesetzter LDH praktisch nicht nachweisbar waren, wurden nach Inkubation mit Polylysin in den Zellüberständen hohe LDH-Konzentrationen nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass die Wirkung von Polylysin auf eine Permeabilisierung der Zellmembran zurückzuführen sein dürfte.

Ohne auf die Theorie festgelegt sein zu wollen, dürfte die Wirkung der erfindungsgemässen pharmazeutischen Zusammensetzung darin bestehen, dass das Peptid mit Hilfe des Adjuvans in die Zielzellen eindringt oder an Zellen bindet, die im endodermalen Bereich der Haut vorkommen. Zielzellen sind u.a. Antigen-präsentierende Zellen, von denen das Peptid, gegebenenfalls nach Prozessierung, den B- und/oder T-Zellen präsentiert wird. Beispiele für Zielzellen sind Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten, Langerhanszellen, dendritische Zellen oder B-Zellen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde untersucht, ob kleine Peptide in Gegenwart von basischen Polyaminosäuren oder glykosylierten Formen von Polykation in verstärktem Ausmass von Makrophagen-artigen Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen werden. Von den verwendeten Zuckerresten ist bekannt, dass sie von Makrophagen über Rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden. (Von APCs wird angenommen, dass sie in vivo den Zelltyp darstellen, der die Peptide aufnimmt und sie anderen Immunzellen präsentiert. Ergebnisse von in vitro Versuchen, die zeigen, dass APCs in Gegenwart der getesteten Adjuvantien erhöhte Mengen von Peptid-Antigenen endozytieren, sind ein Hinweis darauf, dass diese Adjuvantien auch in vivo geeignet sind, die Präsentation der Peptide gegenüber den zytotoxischen Effektorzellen sowie deren Aktivierung zu verstärken, was zu einer insgesamt verstärkten Immunantwort gegen das in der Vakzine enthaltene Target führt.) Als Adjuvantien können auch Komponenten in Partikelform, gegebenenfalls zusätzlich zu den oben erwähnten Adjuvantien, verwendet werden. Für die Partikel sind grundsätzlich Materialien geeignet, die auch für die Herstellung von Säulenmaterial für die Peptidsynthese verwendet werden, z.B. Kieselgel oder Kunstharze, sofern sie physiologisch annehmbar sind und aus ihnen Partikel herstellbar sind, die genügend klein sind, um in die Zelle zu gelangen. Mit Hilfe von Adjuvantien in Partikelform können hohe lokale Konzentrationen an Peptid erreicht werden, was dessen Aufnahme in die Zelle erleichtert.

Die Art des verwendeten Adjuvans, die Zweckmässigkeit seiner Modifikation mit einem zellulären Liganden bzw. der Zusatz von DNA sowie die erforderliche Menge an Adjuvans im Verhältnis zum Peptid können im einzelnen empirisch bestimmt werden, z.B. kann das im einzelnen gewählte Verhältnis von Peptid zu Adjuvans, das prinzipiell über einen weiten Bereich schwanken kann, mittels Titrationen ermittelt werden.

Die Testung von Adjuvantien kann prinzipiell nach denselben Methoden erfolgen wie die Testung der Peptide, gegebenenfalls in mehreren Schritten: Die Fähigkeit eines Adjuvans, die Bindung und/oder Internalisierung eines Peptids an APCs zu erhöhen, kann z.B. in einem ersten Schritt gemessen werden, indem APCs mit fluoreszenzmarkierten Peptiden und Adjuvans inkubiert werden. Eine durch das Adjuvans bewirkte erhöhte Aufnahme bzw.

Bindung kann durch Vergleich mit Zellen, die mit Peptid allein versetzt wurden, mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden.

In einem zweiten Schritt können die zu testenden Adjuvantien in vitro daraufhin untersucht werden, ob und in welchem Ausmass ihre Gegenwart in einer Präsentation eines Peptids auf APCs resultiert, wobei nach den oben für die Testung der Peptide beschriebenen Methoden die MHC-Konzentration auf den Zellen gemessen werden kann.

Eine weitere Möglichkeit zur Testung der Effizienz eines Adjuvans ist die Verwendung eines in vitro Modellsystems. Hierbei werden APCs zusammen mit Adjuvans und Peptid inkubiert und die relative Aktivierung eines T-Zellklons, der das verwendete Peptid spezifisch erkennt, gemessen (Coligan et al., 1991; Lopez et al., 1993). Die Effizienz der Formulierung kann auch über die zelluläre Immunantwort durch den Nachweis einer "delayed-type hypersensitivity" (DTH)-Reaktion in immunisierten Tieren gezeigt werden.

Letztlich wird die immunmodulatorische Wirkung der Formulierung im Tierversuch gemessen. Hierzu können u.a. etablierte Tumormodelle, bei denen von Immunzellen erkannte Peptidsequenzen bekannt sind, eingesetzt werden. Die Vakzine, enthaltend Peptid und Adjuvans, wird in variierenden Verhältnissen, bezogen auf Peptid zu Adjuvans und Gesamtmenge, appliziert. Der Schutz vor Tumorwachstum ist ein Mass für die Wirksamkeit einer Tumervakzine.

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann parenteral, topisch, oral oder lokal verabreicht werden. Vorzugsweise wird sie parenteral, z.B. subkutan, intradermal oder intramuskulär verabreicht, vorzugsweise subkutan oder intradermal, um vor allem Hautzellen (Keratinozyten, Fibroblasten), dendritische Zellen, Langerhanszellen oder Makrophagen als Zielzellen zu erreichen. Im Rahmen einer Tumorthherapie kann die Tumervakzine auch intratumoral verabreicht werden.

Die erfindungsgemässe Zusammensetzung für die parenterale Verabreichung liegt im allgemeinen als Lösung oder Suspension des Peptids und des Adjuvans in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger vor, vorzugsweise einem wässrigen Träger. Als wässrige Träger können z.B. Wasser, gepuffertes Wasser, Salzlösung (0.4 %) Glycinlösung (0.3 %), Hyaluronsäure und ähnliche bekannte Träger verwendet werden. Neben wässrigen Trägern können auch Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid, Propylenglycol, Dimethylformamid und Mischungen davon verwendet werden. Die Zusammensetzung kann ausserdem pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe enthalten, wie Puffersubstanzen sowie anorganische Salze, um einen normalen osmotischen Druck und/oder eine wirksame Lyophilisierung zu erreichen. Beispiele für derartige Zusätze sind Natrium- und Kaliumsalze, z.B. Chloride und Phosphate, Saccharose, Glukose, Proteinhydrolysate, Dextran, Polyvinylpyrrolidon oder Polyethylenglycol. Die Zusammensetzungen können mittels herkömmlicher Techniken sterilisiert werden, z.B. mittels Sterilfiltration. Die Zusammensetzung kann in dieser Form unmittelbar abgefüllt oder auch lyophilisiert und vor dem Gebrauch mit einer sterilen Lösung gemischt werden.

In einer Ausführungsform liegt die erfindungsgemässe pharmazeutische Zusammensetzung als topische Formulierung, z.B. zur dermalen bzw.

transdermalen Applikation vor. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann z.B. als Hydrogel auf Polyacrylsäure- oder Polyacrylamid-Basis vorliegen (wie z.B. Dolobene, Merckle), als Salbe, z.B. mit Polyäthylenglykol (PEG) als Vehikel, wie die Standardsalbe DAB 8 (50 % PEG 300, 50 % PEG 1500), oder als Emulsion, vor allem als Mikroemulsion auf Wasser-in-Öl- bzw. Öl-in-Wasser-Basis, gegebenenfalls auch mit Zusatz von Liposomen. Als Permeationsbeschleuniger ("Schlepper") eignen sich u.a.

Sulfoxid-Derivate wie Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Decylmethysulfoxid (Decyl-MSO) sowie Transcutol (Diethylenglykolmonoethylether) oder Cyclodextrine, des weiteren Pyrrolidone, z.B. 2-Pyrrolidon, N-Methyl-2-pyrrolidon, 2-Pyrrolidon-5-carbonsäure oder das biologisch-abbaubare N-(2-Hydroxyethyl)-2-pyrrolidon und deren Fettsäureester, Harnstoffderivate, wie Dodecylharnstoff, 1,3-Didodecylharnstoff und 1,3-Diphenylharnstoff, Terpene, z.B. D-Limonen, Menthon, α-Terpinol, Carvol, Limonenoxid, oder 1,8-Cineol.

Weitere Anwendungsformen sind Aerosole, z.B. zur Verabreichung als Nasenspray oder zur Inhalation.

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann auch mittels Liposomen verabreicht werden, die in Form von Emulsionen, Schäumen, Micellen, unlöslichen Monolayers, Phospholipiddispersionen, Lamellarschichten und ähnlichem vorliegen können. Diese dienen als Vehikel, um die Peptide zielgerichtet zu einem bestimmten Gewebe, z.B. lymphoidem Gewebe oder Tumorgewebe, zu befördern bzw. die Halbwertszeit der Peptide zu verlängern.

Im Falle des Vorliegens der erfindungsgemäßen Zusammensetzung als topische Formulierung kann diese auch UV-Absorber enthalten, um z.B. bei der prophylaktischen Anwendung gegen Melanom gleichzeitig als Sonnenschutzmittel zu wirken.

Der Fachmann kann geeignete Hilfsstoffe und Formulierungen Standardwerken, wie "Remington's Pharmaceutical Sciences", 1990, entnehmen.

Figurenübersicht Fig. 1: Vakzinierung von DBA/12 Mäusen gegen Mastozytom P815 mit Peptid KYQAVTTTL Fig. 2: Vakzinierung von DBA/2 Mäusen gegen Mastozytom P815 mit Peptid SYFPEITHI Fig. 3: Vakzinierung von DBA/2-Mäusen gegen Mastozytom P815 mit Peptid SYFPEITHI Fig. 4: Vakzinierung von DBA/2-Mäusen gegen Melanom M-3 mit einer Mischung von Peptiden Fig. 5: Vakzinierung von DBA/12-Mäusen gegen Melanom M-3 mittels topischer Applikation Fig. 6: Vakzinierung von DBA/2 Mäusen gegen Melanom M-3-Metastasen Fig. 7: Heilung von M-3 Mikrometastasen tragenden Mäusen nach Vakzinierung mit einer Peptidmischung Fig. 8: Polylysin-vermittelte Beladung von Zellen mit Tyrosinase Fig. 9: T-Zell-Aktivierung nach Vakzinierung im therapeutischen Modell (IFN-γ-Freisetzung von Milzzellen vakzinierter Tiere als Reaktion auf M-3-Zellen) Fig. 10: Induktion antiviraler Immunität mittels Influenzanukleokapsid Peptid ASNENMETM und fukosyliertem Polylysin als Adjuvans (CTL-Aktivierung) Fig. 11: Verstärkung der Bindung von Peptiden an APCs durch basische Polyamino-säuren Fig. 12: Permeabilisierung der Zellmembran durch basische Polyamino-säuren (LDH-Freisetzung nach Behandlung von Zellen mit Polylysin oder Polyarginin) Fig. 13: Internalisierung der Peptide durch Polyarginin Fig. 14: Transport von Peptiden in Antigen-präsentierende Zellen aus Knochenmark Fig. 15: Steigerung des Transports von Peptiden in Antigen präsentierende Zellen mittels polykationischen Polyamino-säuren und Histonen Fig. 16: Transporteffizienz in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad basischer Aminosäuren Fig. 17: Transport von Peptiden mit Polyargininen niedrigen Molekulargewichts Fig. 18: Beeinflussung der Transporteffizienz in Abhängigkeit der

Ladung des Peptids In den folgenden Beispielen wurden, wenn nicht anders angegeben, die folgenden Materialien und Methoden verwendet: A) Zellen a) Zelllinien Die Maus-Melanomzelllinie Cloudman S91 (Klon M-3; ATCC No. CCL 53.1), die Mastrozytomzelllinie P815 (ATCC Nr. TIB 64) und die Monozyten Makrophagen-Zelllinie P388D1 (ATCC TIB 63) wurden von ATCC erworben.

Die Zellen wurden in DMEM-Medium mit hohem Glukosegehalt ("High Glucose DMEM, LifeTechnologies), ergänzt mit 10 %FOS, 2 mM L-Glutamin und 20ug/ml Gentamycin kultiviert. Die Zellen wurden routinemässig auf Fehlen von Mycoplasmen-Kontamination getestet (PCR-Mycoplasma Detection Kit, Stratagene).

Die murine ZelllinieRMNS (Maus-Lymphom) wurde von Kärre et al, 1986 und von Ljunggren et al., 1990, beschrieben.

b) Antigen-präsentierende Zellen aus Knochenmark Zunächst wurden die Oberschenkelknochen von DBA/2-Mäusen gespült. Die Knochenmarkszellen wurden in DMEM-Medium mit hohem Glukosegehalt, enthaltend 10 % FCS, 5 % Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin und 20,ug/ml Gentamycin in Gegenwart von 200 Einheiten/ml Maus-GM-CSF (Li et al., 1989; Genzyme, Cambridge, MA, USA) kultiviert. Während der ersten fünf Tage wurden alle 24 h zwei Drittel des Mediums ausgetauscht, um nichtadhärente Granulozyten und B-Zellen zu entfernen (Inaba et al., 1992).

Sowohi adhärente als auch lose anhaftende Zellen wurden zwischen den Tagen 8 und 10 durch Inkubation mit PBS/5 mM EDTA geerntet und bei einer Zelldichte von 3×10^4 Zellen proWell auf 8-Well-Mikroskop-Objektträger (Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgesät. Mehr als 90 % der Zellen zeigten eine positive Reaktion mit dem Antikörper F4/80 (Endogen, Cambridge, MA, USA).

B) Peptidsynthese Die Peptide wurden auf einem Peptid-Synthesizer (Modell 433 A mit Feedbackmonitor, Applied Biosystems, Foster City, Kanada) unter Verwendung von TentaGel S PHB (Rapp, Tübingen) als Festphase nach der Fmoc-Methode (HBTU-Aktivierung, FastmocTM, Massstab 0:25 mmol) synthetisiert. Die Peptide wurden in 1 M TEAA, pH 7.3 aufgelöst und mittels reverser Chromatographie auf einer Vydac C 18-Säule gereinigt. Die Sequenzen wurden mittels Flugzeitmassenspektrometrie auf einem MAT Lasermat (Finnigan, San Jose, Kanada) bestätigt.

C) Liste der verwendeten Peptide
EMI27.1

<tb> Peptid <SEP> Sequenz <SEP> zugehöriges <SEP> Aminosäure <SEP> MHC
<tb> <SEP> Bezeichnung <SEP> Antigen <SEP> Numerierung <SEP> Haplotyp
<tb> <SEP> im <SEP> Protein
<tb> kpepl17 <SEP> SYFPEITHZ <SEP> Tyrosin-kinase <SEP> 355-363 <SEP> H2 <SEP> Kd <SEP>
<tb> <SEP> JAK1
<tb>kpepl18 <SEP> KYQAVTTTL <SEP> Tum-P198 <SEP> 14-22 <SEP> H2-Kd <SEP>
<tb> <SEP> Kpep162 <SEP> GPPHSNNF <SEP> Tum-P35B <SEP> 4-13 <SEP> H2 <SEP> Dd <SEP>
<tb> <SEP> GY
<tb>Kpep163 <SEP> ISTQNHRLAL <SEP> P91A <SEP> 12-20 <SEP> H2-Ld
<tb> Kpep164 <SEP> LPYLGWLVF <SEP> P815 <SEP> 35-43 <SEP> H2-Ld <SEP>
<tb> <R> Peptidmischungen: Peptidmischung I für M-3 Melanomvakzine:kpepl43, kpepl45, kpepl46, kpepl50.

Peptidmischung III für Mastrozytom P815 Vakzine:kpepl17, kpepl18, Kpep162, Kpep163, Kpep164 D)
Herstellung der VakzinenD1) Einzelpeptidvakzinen a)Einzelpeptidkontrollvakzinen ohne Adjuvans

wurden hergestellt, indem das Peptid in einer Konzentration von 1mg/min PBS aufgenommen wurde.

Die Inkubationszeit bis zur Injektion betrug 4 h bei Raumtemperatur.

b) Einzelpeptidvakzinen mit Polylysin (wenn im folgenden nicht anders angegeben, wurde Polylysin einer Kettenlänge von 200 verwendet) als

Adjuvans wurden hergestellt, indem Peptid und Polylysin in den angegebenen Mengen in HBS gemischt wurden. Die Inkubationszeit bis zur Injektion betrug 4 h bei Raumtemperatur.

i) Um eine Vakzine mit einem Gehalt von 16Cig wirksamen Peptids zu erhalten, wurden 11.8pg Polylysin mit 160pg Peptidkpep 17 in einem Gesamtvolumen von 1 ml HBS gemischt.

ii) Um eine Vakzine mit einem Gehalt von 100pg wirksamen Peptids zu erhalten, wurden 74pg Polylysin mit 1 mg Peptidkpepl 17 in einem Gesamtvolumen von 1 ml HBS gemischt.

c) Einzelpeptidkontrollvakzinen mit Incomplete Freund's Adjuvans (IFA) wurden hergestellt, indem Peptid und IFA in den angegebenen Mengen emulgiert wurden. Die Inkubationszeit bis zur Injektion betrug 30 min bei Raumtemperatur.

i) Für eine Kontrollvakzine, enthaltend 16pg wirksames Peptid, wurden 192 g Peptidkpepl 17 in 600 po HBS mit 600ul IFA emulgiert.

ii) Für eine Kontrollvakzine, enthaltend 100pg wirksames Peptid, wurden 1.2 mg Peptid kpepl 17 in 600 pl HBS mit 600 l IFA IFA emulgiert.

D2) Peptidmischungen als Vakzine a) Peptidmischung I als Kontrollvakzine ohne Adjuvans enthielt 250 g jedes der Peptide kpep143, kpep145, kpep 146, kpepl50 in einem Gesamtvolumen von 1 ml PBS.

b) Peptidmischung III als Kontrollvakzine ohne Adjuvans enthielt 250pg jedes der Peptide kpep 117, kpep 118, Kpep162, Kpep163, Kpep164 in einem Gesamtvolumen von 1 ml PBS.

c) Peptidmischung I als Vakzine mit Polylysin als Adjuvans wurde hergestellt, indem 1 mg Peptidmischung I (enthaltend 250 pg jedes Peptides) mit 74 pg Polylysin in HBS gemischt wurden. Die Inkubationszeit bis zur Injektion betrug 4 h bei Raumtemperatur.

d) Peptidmischung III als Vakzine mit Polylysin als Adjuvans wurde hergestellt, indem 1.25 mg Peptidmischung III (enthaltend 250pg jedes Peptides) mit 93pg Polylysin in HBS gemischt wurden. Die Inkubationszeit bis zur Injektion betrug 4 h bei Raumtemperatur.

e) Peptidmischung I als Kontrollvakzine mit Incomplete Freund's Adjuvans wurde hergestellt, indem 1.2 mg Peptidmischung I in 600,ul HBS (enthaltend 300pg jedes Peptides) mit 600 l IFA emulgiert wurden. Die Inkubationszeit bis zur Injektion betrug 30 min bei Raumtemperatur.

f) Peptidmischung III als Kontrollvakzine mit Incomplete Freund's Adjuvans wurde hergestellt, indem 1.5 mg

Peptidmischung III in 600Pl HBS (enthaltend 300pg jedes Peptids) mit 600Pl IFA emulgiert wurden. Die Inkubationszeit bis zur Injektion betrug 30 min bei Raumtemperatur.

g) Für die topische Verabreichung mit Polylysine als Adjuvans wurden 1 mg Peptidmischung I (enthaltend 250pg jedes Peptids) mit 74µg Polylysine 4 h lang in einem Gesamtvolumen von 400 µl HBS inkubiert. Die erhaltene Mischung wurde in 1.6 g des Hydrogels DOLOBENE (Merckle) eingebracht.

h) Für die topische Verabreichung einer Kontrollvakzine ohne Adjuvans wurde 1 mg Peptidmischung I (enthaltend 250pg jedes Peptids) in einem Gesamtvolumen von 200µl HBS in 1.8 g des Hydrogels DOLOBENE (Merckle) eingebracht.

i) Die Herstellung von Fruktose-gekoppeltem Polylysine (Kettenlänge: 240 bzw. 200) wurde nach der von MacBroom et al., 1992, beschriebenen Methode vorgenommen, wobei eine Substituierung von ca. 40% erzielt wurde (die Ausgangsmaterialien p-L-Fruktopyranosylphenyl-isothiocyanat und Polylysine wurden von Sigma bezogen).

j) Wenn Transferrin-Polylysine-Konjugate (hergestellt, wie in der WO 93/07283 beschrieben) verwendet wurden, wurde die Menge so eingestellt, dass die absolute Menge an Polylysine 75 pg pro mg Peptid betrug. Wenn Plasmid-DNA (Leerplasmid pSP65, LPS-frei, Boehringer Mannheim) in die Komplexe integriert wurde, betrug das Verhältnis 37.5pg DNA/75 pg Polylysine/1 mg Peptid. Im Falle der Verwendung von 160pg statt 1 mg Peptid wurden die Mengen der anderen Komponenten um denselben Faktor (6.25) reduziert.

E) Injektion der Vakzine

Vor der subkutanen Injektion wurden die Mäuse in Gruppen von bis zu acht Tieren in einer isolierten Luftkammer anästhesiert. Nach 3.5 min Halothan-Behandlung (4 % in O₂, Flussrate 4) waren die Mäuse ca. 1 min lang betäubt; in dieser Zeit wurde die Vakzine subkutan injiziert.

Die intraperitoneale Injektion erfolgte ohne vorherige Anästhesierung.

Das Injektionsvolumen war für jede Vakzine 100µl pro Tier, das entspricht 100 pg Einzelpeptid oder Peptidmischung I pro Tier. Im Fall von Peptidmischung III wurden 125 pg Gesamtpeptidmenge pro Maus appliziert.

F) Topische Anwendung der Vakzine

Pro Maus wurden 200 mg Salbe, enthaltend 100 µg Peptid oder Peptidmischung I bzw. 125µg Peptidmischung I, in die Haut der rasierten Tiere eingerieben, und zwar in den gesamten Rücken und in die Ohren. Die richtige Menge wurde mit einer Waage kontrolliert.

G) Anwendung der Vakzine gegen Tumorstadium im Mausmodell

Das Protokoll der Testung der Wirksamkeit der Krebsvakzinen im prophylaktischen oder im therapeutischen Mausmodell entsprach, wenn nicht anders angegeben, dem in der WO94121808 beschriebenen

Prinzip, wobei als Mausmodell das DBA/2-Modell verwendet wurde.

Beispiel 1 Vakzinierung von DBA/2 Mäusen gegen Mastozytom P815 160pg des Peptids der Sequenz KYQAVTTTL (kpep1 18), abgeleitet von dem von Lethe et al., 1992, beschriebenen Tumorantigen P815, einem Liganden von H2-Kd, wurden mit 11.8µg Polylysine 300 in 500Pl HBS gemischt und 4 h bei

Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 500 µl EBSS (Earl's gepufferte Salzlösung) beigegeben. Je 100 µl der erhaltenen Mischung wurden 8 Mäusen in einwöchigem Abstand subkutan verabreicht.

Nach dieser Vorimmunisierung wurden nach einer weiteren Woche Tumoren gesetzt, indem jeder Maus contralateral 5×10^4 Zellen der Mastrozytomzelllinie P815 (ATCC Nr. TIB 64; diese Zellen exprimieren das Tumorantigen, von dem das Peptid P815 abgeleitet ist) in 100 µl EBSS injiziert wurden. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Fig. 1 (gefüllte Quadrate) dargestellt.

In einem Parallelversuch wurden 200 µg des Peptids mit 500 µl HBS gemischt und anschliessend mit 500 µl Freund's Adjuvans emulgiert. Mit je 100 µl der erhaltenen Emulsion wurden 8 Mäuse vorimmunisiert und anschliessend mit P815-Zellen Tumoren gesetzt, wie oben angegeben (Fig. 1: gefüllte Kreise).

Für einen weiteren Parallelversuch wurde eine zelluläre Tumorstoffimpfung wie folgt hergestellt: 160 µg Peptid kpep 118 wurden mit 3 µg pg Transferrin-Polylysin (TfpL), 10 µg pL und 6 µg Plasmid psp65 (LPS-frei) in 500 µl HBS-Puffer gemischt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die obige Lösung in eine T 75 Zellkulturflasche mit 1.5×10^6 Zellen der allogenen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 (ATCC Nr. CRL 1658) in 20 ml DMEM-Medium (10 % FCS, 20 mM Glukose) gegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 3 h wurden die Zellen mit 15 ml frischem Medium versetzt und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. 4 h vor der Applikation wurden die Zellen mit 20 Gy bestrahlt. Die Aufarbeitung der Vakzine erfolgte, wie in der WO 94/21808 beschrieben. Die Vorimmunisierung mit dieser Vakzine wurde in einwöchigem Abstand mit 10⁵ Zellen vorgenommen; nach einer weiteren Woche wurde die Tumorstoffimpfung durchgeführt, wie oben beschrieben (Fig. 1: gefüllte Dreiecke). Es zeigte sich, dass die Vakzine, die das Peptid mit Polylysin vereinigt enthielt, die Mäuse am besten vor Tumorbildung schützte.

Beispiel 2 Vakzinierung von DBA/2 Mäusen gegen Mastrozytom P815 mit einer Einzelpeptidvakzine a) Drei Einzelpeptid-Vakzinen, enthaltend entweder Peptid kpep117 allein in PBS (Fig. 2a), Peptid kpep117, emulgiert in IFA (Fig. 2b), oder Peptid kpep117 mit Polylysin (Kettenlänge: 240) als Adjuvans (Fig. 2c), wurden auf ihre protektive Wirkung gegen eine P815-Tumorstoffimpfung getestet.

Die Vakzinen wurden, wie oben in Abschnitt D beschrieben, hergestellt. Das Injektionsvolumen betrug jedesmal 100 µl; die Injektion wurde subkutan (sc) oder intraperitoneal (ip) vorgenommen. Naive Mäuse dienten als Negativkontrolle, eine Ganzzellvakzine, bestehend aus GM-CSF sekretierenden P815 Zellen als Positivkontrolle (P815-GM-CSF; 10⁵ Zellen in 100 µl wurden pro Tier subkutan injiziert). Jede Versuchsgruppe bestand aus acht Tieren, es wurden drei Vakzinierungen (sc) in siebentägigen Abständen vorgenommen. Eine Woche nach der letzten Vakzinierung erhielten die Tiere eine contralaterale Tumorchallenge mit 5×10^4 P815-Zellen. Die Tiere wurden täglich inspiziert, das Auftreten von Tumoren wurde in wöchentlichem Abstand kontrolliert.

Das Peptid kpep117 mit Polylysin als Adjuvans erzielte die beste Anti Tumorstoffimpfung, wenn 100 µg pro Tier subkutan injiziert wurden (drei von acht Tieren geschützt). Dieser Effekt war annähernd so gut wie der mit der Ganzzellvakzine erzielte (vier von acht Tieren geschützt). 16 µg Peptid zusammen mit Polylysin pro Tier war weniger wirksam (zwei Tiere geschützt), aber deutlich besser als 100 µg Peptid in PBS (Fig. 2a, keine Schutzwirkung). Auch emulgiert in IFA erzielte das Peptid nicht die Wirkung, die es zusammen mit Polylysin leistet (Fig. 2c).

b) In einem weiteren Experiment im P815 Mastrozytom-Modell wurden zwei unmodifizierte Polylysine unterschiedlicher Kettenlänge miteinander verglichen, ein kurzes mit nur 16 Lysinresten (pL16) und ein langes mit 240 Resten (pL240). Den Tieren der Kontrollgruppen wurden 100 µg Peptid kpep 117, entweder in PBS gelöst oder in IFA emulgiert, injiziert. Zwei GM-CSF sekretierende zelluläre Kontrollvakzine wurden als Positivkontrolle verwendet (vgl. a)), wobei eine Vakzine aus stabil transfizierten P815-Zellen und die zweite Vakzine mittels transienter Transfektion unter Verwendung der von Wagner et al., 1992,

beschriebenen Methode (AVET) erhalten wurde.

Die beiden Ganzzellvakzinen verliehen vier bzw. fünf von insgesamt acht Tieren Schutz. Die Vakzinen auf der Grundlage von Peptiden, die aus Peptid allein oder dem in IFA emulgierten Peptid bestanden, zeigten keine Schutzwirkung; alle Tiere entwickelten bald nach der Tumorsetzung Tumore.

Wenn jedoch das Peptid gemeinsam mit Polylysin verabreicht wurde, schützte die Peptidvakzine die Tiere gegen die Tumorsetzung: zwei von acht Tieren waren geschützt, wenn das lange Polylysin (pL240) verwendet wurde, und vier von acht Tieren im Fall des kurzen Polylysins. Diese Ergebnisse, die in Fig. 3 dargestellt sind, zeigen, dass ein einzelnes Peptid, wenn es mit Polylysin als Adjuvans verabreicht wird, einen effizienten Antitumorschutz bewirkt, der vergleichbar ist mit dem einer der wirkungsvollsten Zytokinsekretierenden Ganzzellvakzine, die in der Literatur als Standard für Antitumor-Vakzinierung herangezogen wird (Dranoff et al., 1993; Schmidt et al., 1995).

Beispiel 3 Vakzinierung von DBA/2 Mäusen gegen Mastrozytom P815 mit einer Tumervakzine, enthaltend P815-Einzelpeptide oder Mischungen von P815-Peptiden Für die Herstellung der Vakzine wurden die folgenden Peptide verwendet: kpep118 (100,ug pro Injektion) Peptidmischung lil(kpep117, kpep118, kpep162, kpep163, kpep164) diese Peptidmischung enthielt alle bisher bekannten P815-Peptide; pro Injektion wurden 25,ug jedes Peptids verabreicht).

Als positive Kontrolle wurden GM-CSF sekretierende P815-Zellen verwendet.

In Vorversuchen hatte sich kpep117 als das Peptid mit der besten Schutzwirkung gegen eine P815-Tumorsetzung erwiesen, wenn 100pg Peptid zusammen mit Polylysin (7,5,ug Polylysin/100,ug Peptid, entsprechend dem Standardverhältnis; Polylysin: Kettenlänge = 200) verwendet wurden. Eine geringere Menge (16pg) kpep117 war weniger wirksam gewesen. In diesem Beispiel wurden 100 cit kpep118 pro Tier injiziert, und zwar einmal nur mit Polylysin (Gruppe B), einmal mit Transferrin Polylysin (Gruppe C) und einmal mit Transferrin-Polylysin/DNA (Gruppe D).

Als Kontrolle wurde kpep118 mit IFA verwendet. In diesem Experiment zeigte kpep118 allein keine Schutzwirkung gegen die Tumorsetzung.

In den in Beispiel 4 durchgeführten Versuchen wurde gezeigt, dass eine Vakzine, enthaltend eine Peptidmischung aus Melanompeptiden, eine Schutzwirkung gegen Melanom aufweist. Es wurde daher in diesem Beispiel getestet, ob sich das Konzept der Peptidmischung auch für P815 eignet.

Die Peptidmischung lil wurde einmal nur mit Polylysin (Gruppe E), einmal mit Transferrin-Polylysin (Gruppe F) und einmal mit Transferrin-Polylysin/DNA (Gruppe G) verabreicht. Als Kontrolle wurde Peptidmischung III in IFA verwendet. Als Negativkontrolle wurden naive Mäuse verwendet; als positive Kontrolle GM-CSF-transfizierte P815-Zellen (105 Zellen pro Maus).

Die in diesem Beispiel durchgeführten Versuche entwickelten sich, im Vergleich zu den anderen Versuchen, eher untypisch: in der positiven Kontrollgruppe (GM-CSF sekretierende Zellen) entwickelten alle Tiere bald nach der Tumorsetzung Tumoren, wobei die meisten dieser Tumoren ebenso schnell verschwanden, wie sie entstanden waren. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Tumor eine Weile wuchs, bevor er zerstört wurde. Eine zweite mögliche Erklärung wäre, dass die als Tumor diagnostizierte Schwellung nicht vom Tumorstadium herrührte, sondern von einem starken Immunzellinfiltrat (Granulom). Da die Tiere nicht seziiert wurden, konnte die Ursache nicht definitiv festgestellt werden; jedenfalls wurden die gesetzten Tumoren letztlich zerstört. Ein weiteres interessantes Ergebnis wurde in Gruppe G erhalten, in der die Tiere mit einer Kombination aus Peptidmischung III und Polylysin behandelt wurden. Alle Tiere entwickelten Tumoren, aber in zwei der Tiere war die Grösse der Schwellung des

Tumors (bzw. des Immunzellinfiltrats) relativ gering, nahm nicht zu, und die Mäuse sahen nicht ungesund aus. Diese beiden Tiere wurden nicht getötet, sondern weiter unter Beobachtung gehalten.

Überraschenderweise waren die Tumoren neun Wochen nach der Tumorsetzung nicht mehr nachweisbar, ein bisher nicht beobachtetes Ergebnis. Zwei von acht Tieren zerstörten schliesslich ihre Tumorlast. Die Zerstörung der Tumoren dürfte auf den Gehalt an kpepl 17 in der Peptidmischung zurückzuführen sein, was in Analogie zu Beispiel 2 stünde, wo zwei von acht Tieren mit 16pg kpepl 17 und drei von acht Tieren mit 100pg kpepl 17 geschützt waren. Die Schutzwirkung könnte jedoch auch durch mehr als ein Peptid der Mischung hervorgerufen worden sein.

Beispiel 4 Schutz von DBA/2-Mäusen gegen Melanom M-3 durch Vorimmunisierung mit einer Tumorstoffvakzine, enthaltend eine Mischung von Peptiden Es wurde eine prophylaktische Vakzine verwendet, die eine Mischung von Melanompeptiden (Peptidmischung I, Abschnitt D2) enthielt.

Das Protokoll der Vorimmunisierung mit der Vakzine sowie die Setzung der Tumoren entsprach dem in Beispiel 2 beschriebenen Protokoll, mit dem Unterschied, dass die Tumorsetzung mit M3-Zellen (10⁵ Zellen pro Tier) vorgenommen wurde. Als Kontrollvakzine wurde eine Ganzzellvakzine aus M-3-Zellen benutzt, die eine optimale Menge IL-2 (1000 - 2000 Einheiten pro 10⁵ Zellen) sekretiert und hergestellt wurde, wie von Schmidt et al., 1995, beschrieben. Unter den gewählten Versuchsbedingungen erzielte diese Vakzine einen 100%igen Schutz (Fig. 4). Vier Gruppen von Versuchstieren wurden die Vakzinen mit der Peptidmischung verabreicht. Zwei Gruppen erhielten, entweder s.c. oder i.p., die Peptide emulgiert in IFA. Die anderen beiden Gruppen erhielten, entweder s.c. oder i.p., die Peptide zusammen mit Polylysin (pL240).

Fig. 4 illustriert den Schutzeffekt der Peptidvakzine mit Polylysin (pL240) als Adjuvans; 50 % der behandelten Mäuse waren gegen die M-3 Tumorchallenge geschützt im Vergleich zu unbehandelten Tieren, in denen sich rasch solide Tumoren entwickelten. Diese Wirkung konnte erzielt werden, wenn die Peptid-Polylysin-Vakzine subkutan injiziert oder als Hydrogel auf die Haut aufgetragen wurde (Fig. 5). In den anderen drei Kontrollgruppen, die mit den Peptid/Polylysin-Vakzinen i.p. oder mit Peptiden in IFA behandelt wurden, war die Vakzine im wesentlichen unwirksam. Hier wurden die gesetzten Tumoren nicht abgestossen, und die Tumoren wuchsen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren mit einer nur geringen Verzögerung. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Peptidmischung enthaltende Vakzine eine Antitumor-Schutzwirkung erzielt, wenn sie Polylysin enthält. Unter den gewählten Versuchsbedingungen war diese Peptid Vakzine nur halb so wirksam wie die zelluläre IL-2-Vakzine, welche, in Übereinstimmung mit kürzlich erschienenen Berichten (Zatloukal, 1993, Zatloukal, 1995), bis zu 100 % der Tiere gegen die Tumorsetzung mit 10⁵ lebenden M3-Zellen schützte.

Beispiel 5 Schutz von DBA/2 Mäusen gegen M-3 Metastasen a) Es wurde eine therapeutische Vakzine verwendet, die eine Mischung von Melanompeptiden (Peptidmischung I, beschrieben in Abschnitt D2) enthielt. Es wurden drei Vakzinierungen (sc) in einwöchigem Abstand verabreicht. Die erste Vakzinierung erfolgte fünf Tage nach der Metastasensetzung, es wurde demnach gegen eine Fünftagesmetastase geimpft. 1.2 x 10⁴ M-3 Zellen wurden für die Metastasensetzung injiziert, es wurde das in der WO 94/21808 und bei Schmidt et al., 1996, beschriebene Protokoll verwendet.

Als Vakzine wurde Peptidmischung I verwendet: ohne Adjuvans (pepmixi PBS), mit IFA als Adjuvans (IFApepmixl) oder mit Fucosemodifiziertem Polylysin (fpL pepmixl). Kontrollgruppen erhielten keine Vakzine (naive) oder die in Beispiel 4 aufgeführten IL-2 produzierende M-3 Ganzzellvakzine. Fig. 6 zeigt, dass der beste Schutz in der Gruppe erzielt wurde, die mit Peptidmischung I mit Fucose-modifiziertem Polylysin als Adjuvans behandelt wurde (Fig. 6a). 50 % der Mäuse konnten die Metastasen abstoßen (4/8). Diese Behandlung war sogar wirksamer als die mit der Ganzzellvakzine, die nur 33 % der Mäuse schützte (3/9). Die Peptidvakzine mit IFA oder ohne Adjuvans führte lediglich zu einer Verzögerung beim Auswachsen der Metastasen zum Tumor (Fig. 6b).

b) In einem weiteren Experiment wurde im therapeutischen Modell die Schutzwirkung einer Vakzine untersucht, die die Peptidmischung I enthielt und subkutan verabreicht wurde. Kontrollgruppen erhielten die Peptidmischung in PBS (ohne Adjuvans) oder mit IFA. Als Adjuvans wurde unmodifiziertes Polylysin 240 verwendet. Ausserdem wurde als Adjuvans Fukose-modifiziertes Polylysin 200 (fpL 200) verwendet. Als Kontrolle wurde eine Gruppe von Tieren mit der IL-2 exprimierenden zellulären Vakzine in dieses Experiment aufgenommen. Wie in Fig. 7a gezeigt wird, war die Peptid/Polylysin-Vakzine bei der Behandlung von M3-Metastasen wirksam.

Eine signifikante Heilungsrate wurde in diesem Versuch nur mit dem Fukosemodifizierten Polylysin erreicht. Bei dieser Behandlung stiessen 50 % der Tiere die Metastasen ab, was im Vergleich zur IL-2-Vakzine, die in diesem Fall 70 % der Tiere heilte, ein guter Wert ist.

c) In einem weiteren Experiment wurde im therapeutischen Modell getestet, wie sich Änderungen und Modifikationen des Polykations auf die Antitumorwirkung auswirken. Dabei wurden zusätzlich zum nichtmodifizierten und zum Fukose-modifizierten Polylysin 200 das kurze, nichtmodifizierte Polylysin pL16, ein langes Polylysin pL450 und ein weiteres Polykation, nämlich Polyarginin (pArg720) getestet. Als positive Kontrolle wurde eine zelluläre, eine optimale Menge (> 10 ng pro 10^5 Zellen) GM-CSF sekretierende M3-Vakzine verwendet (Schmidt, 1995). Auch in diesem Versuch enthielten Kontrollgruppen die Peptidmischung in IFA oder ohne jedes Adjuvans. Wie auch im Beispiel 5 b) wurde die beste Wirkung erzielt, wenn Fukose-Polylysin als Adjuvans verwendet wurde Fig. 7b. In diesen Gruppen stiessen 40 % der Tiere die Metastasen ab, im Vergleich zu 30 % in der Gruppe mit dem kurzen Polylysin pL16. Ausser in der Gruppe, die die Peptide zusammen mit Polyarginin erhalten hatten, zeigten die Tiere der anderen Gruppen, denen eine Peptid-Vakzine verabreicht worden war, nur eine kurze Verzögerung bei der Entstehung von Tumoren. Das nichtmodifizierte Polyarginin war in diesem Versuch genauso wirksam wie das Fukose-modifizierte Polylysin, es führte zur Abstossung der Metastasen in vier von zehn Tieren.

Fig. 7c zeigt die Wiederholung dieses durch Polyarginin erzielten Effekts in einem unabhängigen Experiment. Auch hier zeigte die Vakzinierung mit der Peptidmischung in Verbindung mit Polyarginin in vier von acht behandelten Tieren eine Antitumorwirkung.

Beispiel 6 Transloading von Zellen mit Tyrosinase unter Verwendung von Polylysin als Adjuvans Dieses Beispiel diente als Versuch, der zeigen sollte, dass Polylysin als Adjuvans für die Beladung von Zellen mit grösseren Proteinfragmenten oder ganzen Proteinen geeignet ist, wobei als Zellen stellvertretend M-3-Zellen verwendet wurden.

Für die Beladung der Zellen wurden zunächst 160pg FITC-markierte Tyrosinase (EC 1.14.18.1; Sigma) mit 3pg Polylysin (pL240) versetzt und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die erhaltene Lösung in eine T 75 Zellkulturflasche mit 2×10^6 M-3-Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit PBS/2 mM EDTA abgelöst und in 1 ml PBS/5 % FCS zur FACS-Analyse aufgenommen. Fig. 8 zeigt die Beladung von M-3-Zellen mit Tyrosinase (die linke Kurve zeigt die Kontrolle, die rechte die Beladung mit Tyrosinase).

Beispiel 7 Bestimmung der T-Zell-Aktivierung nach Immunisierung im therapeutischen Modell Nachdem die Peptid/Polykation-Vakzine im therapeutischen Mausmodell (vgl.

Beispiel 5) eindeutig eine Wirkung gezeigt hatte, wurde untersucht, ob diese Behandlung auch zur Aktivierung von T-Zellen führt. Dafür wurde Zytokinsekretion nach Co-Inkubation von Milzzellen vakzinierter Tiere mit parentalen M3-Zellen stellvertretend als Marker herangezogen (Kawakami et al., 1994b).

Es wurden Einzelzell-Milz-Suspensionen aus vakzinierten und unbehandelten Tieren hergestellt, gefolgt von Erythrozytenlyse mit hypotonischem Puffer (0.15NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH 7.4). Adhärenz Zellen wurden entfernt, indem 3 x 10⁶ Milzzellen pro ml DMEM-Medium (10 % FCS) in Petrischalen 90 min lang bei 37°C inkubiert wurden. Nicht-adhärenz Zellen wurden durch vorsichtiges Pipettieren und Co-Kultivieren mit 1 x 10³ parentalen Zellen in verschiedenen Mengenverhältnissen co-kultiviert. Die Zellen wurden in 200 µl DMEM-Medium (10 % FCS), 2 mM L-Glutamin und 20 µg/ml Gentamycin in 96 Well-Flachboden-Gewebekulturschalen kultiviert.

Am Tag 9 wurden 100 µl Überstand geerntet und der jeweilige IFN-γ-Gehalt unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Endogen, Cambridge, MA, USA) nach Vorschrift des Herstellers gemessen. Es zeigte sich, dass nach neun Tagen Inkubation nur Milzzellen von vakzinierten Tieren grössere Mengen an IFN-γ ins Medium sekretierten, während in den Co Kulturen von Milzzellen unbehandelter Tiere und M3-Zellen praktisch kein IFN-γ nachweisbar war. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Fig. 9 dargestellt.

Beispiel 8 Induktion antiviraler Immunität mittels Influenza nukleokapsid-Peptid ASNENMETM und fukosyliertem Polylysin als Adjuvans Es wurde eine Vakzine eingesetzt, die pro 1 mg Peptid ASNENMETM 75 µg fpLys enthielt. Die Vakzine wurde durch einmalige Injektion, wie im Methodenteil angegeben, verabreicht, wobei pro Tier 100 µg Peptid/7.5 µg fpLys injiziert wurden. Zur Kontrolle erfolgte die Injektion von 100 µg Peptid allein (PBS) beziehungsweise wurde keinerlei Injektion vorgenommen (naive Kontrolle).

RMA-S Maus-Lymphom-Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium bei 26°C mit 10 µg/ml Peptid ASNENMETM inkubiert.

10 Tage nach der Vakzinierung wurden Milzzellen aus den vakzinierten Tieren isoliert, mit den Peptid-beladenen RMA-S Zellen im Verhältnis 5:1 gemischt und fünf Tage lang weiterkultiviert (Stuber et al., 1994). Die Zahl der überlebenden Effektor-Milzzellen in den verschiedenen Kulturen wurde bestimmt, dann wurden die Zellen für die Bestimmung der CTL-Aktivität mittels Standard 4 h - Europium-Freisetzungs-Assay (Blomberg et al., 1993) in verschiedenen Verhältnissen mit RMA-S Zellen vermischt, die zuvor mit dem Peptid ASNENMETM und mit Europium-Chelat versetzt worden waren.

Wie Fig. 10 zeigt, wurde die spezifische Immunität in diesem Versuch nur durch Vakzinierung mit Peptid und fpLys erzielt, nicht jedoch, wenn das Peptid allein verabreicht wurde.

Beispiel 9 Testung verschiedener basischer Polyamino säuren auf ihre Fähigkeit, die Internalisierung und/oder Bindung von Peptiden an APCs zu verstärken Für diese Tests wurde ein Fluoreszenzassay verwendet: Ein Modell Peptidantigen der Sequenz LFEAIEGFI (MHC Kd-restringiert) wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) nach Vorschrift des Herstellers (Molecular Probes) markiert. Die Aufnahme bzw. Bindung von FITC-markiertem Peptid allein ("pulsed") oder zusammen mit verschiedenen Konzentrationen von basischen Aminosäuren (Polylysin mit einer Kettenlänge von 16 bis 490, Polyarginin mit einer Kettenlänge von 15 bis 720) durch die MHC Kd-restringierte Monozyten-M 1996) aufgenommen werden. Ein alternativer Mechanismus kann darin bestehen, dass die Polyamino säuren die Zellmembran durchlässig machen können und auf diese Weise die Diffusion von Peptiden vom Medium ins Zytoplasma ermöglichen.

a) Ob eine Permeabilisierung der Zellmembran stattfindet, wurde getestet, indem die Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) nach Inkubation von P388D1-Zellen mit Polyamino säuren (Polylysin oder Polyarginin) unter isotonischen Bedingungen unter Verwendung des käuflich erhältlichen Kits (Cytotox 96, Promega, Madison, Wisconsin, USA) nach Vorschrift des

Herstellers gemessen wurde. Aufgrund der in Fig. 12a erhaltenen Ergebnisse ist anzunehmen, dass die Wirkung von pLys darin besteht, dass es die Zellmembranen durchlässig macht, was sich in hohen Konzentrationen von unter isotonischen Bedingungen freigesetztem zytoplasmatischem Enzym äußert. Im Gegensatz dazu wurde nach pArg Behandlung (Fig. 12b) praktisch kein LDH nachgewiesen. Beim Vergleich von Proben, die mit Polyaminosäuren allein behandelt worden waren, wurde im Vergleich zur Behandlung mit einer Mischung von Polylysin oder Polyarginin mit Peptid kein Unterschied in der LDH-Freisetzung festgestellt.

Nach Inkubation mit Peptid allein wurde keine messbare LDH-Aktivität nachgewiesen.

b) Ob eine Internalisierung von FITC-markierten Peptiden in Gegenwart oder Abwesenheit von basischen Polyaminosäuren stattfindet, wurde auf der Grundlage des von Midoux et al., 1993, veröffentlichten Prinzips untersucht: Von Zellen internalisierte Partikel werden in Endosomen transportiert. Im Vergleich zum Zytoplasma oder Zellkultur-Medium, die neutrale pH-Werte aufweisen, sind diese Organellen mit einem pH-Wert von ca. 5 sauer. Die von FITC emittierte Fluoreszenz ist stark pH-abhängig. In einer Umgebung mit niedrigen pH-Bedingungen, wie sie in Endosomen zu finden sind, wird die Fluoreszenz unterdrückt. Daher zeigen FITC-markierte Peptide, die von den Zellen in die Endosomen aufgenommen werden, eine verminderte Fluoreszenz. Bei Zugabe von Monensin wird der niedrige pH-Wert der Endosomen neutralisiert, was zu einer messbaren verstärkten Fluoreszenz der internalisierten FITC-markierten Peptide führt.

Die Zellen wurden mit einer Mischung aus Polyarginin (durchschnittlicher Molekulargewichtsbereich 100.000, Kettenlänge 490) und Fluoreszenzmarkiertem Peptid bei 4°C oder 37°C inkubiert. Ein Aliquot der bei 37°C inkubierten Proben wurde zurückgehalten und vor der Durchflusszytometrieanalyse bei 4°C mit 50 µM Monensin behandelt.

Es zeigte sich, dass die Inkubation von APCs mit bestimmten basischen Polyaminosäuren wie Polylysin (pLys) und Polyarginin (pArg) die Aufnahme bzw. Bindung der Peptide an APCs verstärkt.

Wie sich aus Fig. 13 ergibt, wurde in Zellen, die mit Peptid allein und mit Monensin behandelt worden waren, nur ein geringer Anstieg der Fluoreszenz beobachtet. Im Gegensatz dazu waren die Fluoreszenzsignale in Proben, die mit Monensin und einer Mischung aus Polyarginin und Peptid behandelt worden waren, stark erhöht. Keine Peptidaufnahme wurde beobachtet, wenn die Proben bei 4°C inkubiert wurden. Ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz nach Monensinbehandlung weist darauf hin, dass die mit pArg bewirkte Beladung der Peptide dazu führt, dass diese in Vesikeln innerhalb der Zelle akkumuliert werden (Midoux et al., 1993; Fig. 13). Wie erwartet, wurde nach Monensin-Behandlung von Polylysin-beladenen Proben nur ein geringer Anstieg der Fluoreszenz beobachtet. Das Beladen mit Polylysin bei 4°C bewirkte einen messbaren Anstieg der Fluoreszenz, was ein weiterer Hinweis dafür ist, dass die Wirkung von Polylysin hauptsächlich auf eine Permeabilisierung der Zellmembranen zurückzuführen ist (Fig. 12b).

Beispiel 11 Untersuchung der Beladung von APCs mit kurzen Peptiden Aus Knochenmark stammende, mit GM-CSF erhaltene APCs wurden mit einer Kombination eines fluoreszenzmarkierten Peptids plus Polylysin (pL200; Sigma) oder mit Peptid allein mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Für den mikroskopischen Nachweis der Peptidaufnahme wurden die APCs auf Objektträger ausgesät und mit 40 µg Fluorescein-markiertem Peptid LFEAIEGFI allein oder mit einer Mischung mit 50 µg/ml Polylysin (pL200) und 40 µg/ml Peptid LFEAIEGFI 30 min bei 37°C inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen wurden die Zellen mit 4 % para-Formaldehyd fixiert, mit anti-Fadent (Dako, Glostrup, Dänemark) eingedeckt und fluoreszenzmikroskopiert (Zeiss). Die Kerne wurden mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Sigma) gegengefärbt. Wie in den Fluoreszenzmikrofotografien von Fig. 14 gezeigt wird, weisen die Zellen, die mit Peptid und Polylysin inkubiert worden waren (A), gegenüber den Zellen, die mit dem Peptid allein (B)

behandelt worden waren, eine deutlich verstärkte Aufnahme des Peptids auf. Während die Fluoreszenz bei den Zellen, die nur mit Peptid allein behandelt ("pulsed") worden waren, nur vereinzelt und teilchenförmig auftrat, zeigte sich die intensive Fluoreszenz der in Gegenwart von Polylysin mit Peptid beladenen Zellen als nicht lokalisiert und im allgemeinen gleichmässiger über die ganze Zelle verteilt.

Beispiel 12 Quantitative Bestimmung der Beladung von Zellen mit Peptid mittels Durchflusszytometrie ("Transloading Assay") a) Nachdem sich in den im Beispiel 11 durchgeführten Versuchen gezeigt hatte, dass APCs für das Beladen mit kleinen Peptiden hervorragende Zielzellen sind, wurden in vitro FACS-Assays durchgeführt, um geeignete Adjuvantien für Peptid-Vakzine zu identifizieren. Dieser Assay erlaubt eine rasche quantitative Testung fluoreszenzmarkierter Peptide; als Modell-Peptid wurde das Peptid der Sequenz LFEAIEGFI verwendet. In diesen Versuchen wurden als APCs die Mauszelllinie P388D1 verwendet. 1×10^6 Zellen wurden in einem Endvolumen von 1 ml DMEM-Medium mit hohem Glukosegehalt und 10 % FCS 30 min bei 37°C mit 5 pg Peptid bei einer Fluorescein Endkonzentration von 5 nmol/ml inkubiert. Die Zellen wurden entweder mit Peptid allein oder mit einer Kombination von Peptid und Polykationen oder von Peptid und Histonen bei steigenden Konzentrationen (3 bis 50 pg/ml), wie in Fig. 15 angegeben, behandelt. Es wurden die folgenden Verbindungen verwendet: A: Polyornithin (durchschnittlicher Molekulargewichtsbereich 110,000, Kettenlänge 580); B: argininreiches Histon; C: lysinreiches Histon; D: Polyarginin (durchschnittlicher Molekulargewichtsbereich 100,000, Kettenlänge 490); E: Polylysin (durchschnittlicher Molekulargewichtsbereich 94,000, Kettenlänge 450). In Vorversuchen wurde ermittelt, dass eine inkubationszeit von 30 min eine maximale Peptidaufnahme ergab. Eine längere Behandlung (4 bzw. 8 h) ergab keine signifikante Steigerung des Fluoreszenzsignals. Vor der Analyse wurden die Zellen 5 x mit einem grossen Volumen PBS, enthaltend 0.2 % BSA, gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml eiskaltem PBS/0.2 % BSA wieder aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie (FACScan; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) untersucht.

Polyarginin und Polylysin erwiesen sich als die wirksamsten Adjuvantien; Polyornithin zeigte unter den gewählten Bedingungen eine zytotoxische Wirkung. Die Verstärkung der Peptidaufnahme durch Polyarginin und Polylysin korreliert mit der Konzentration (Fig. 15 d, e); die Aufnahme nimmt mit der Kettenlänge zu (Fig. 16).

*Es wurde beobachtet, dass Polyarginin mit einer Steigerung von 3 Zehnerpotenzen gegenüber der Kontrolle einen breiteren geeigneten Konzentrationsbereich aufweist als Polylysin, das eine maximale Steigerung von weniger als 2 Zehnerpotenzen zeigte, und dass es bei allen verwendeten Kettenlängen für den Transport von Proteinen wirkungsvoller ist, als Polylysin (Fig. 16): Polyarginin ermöglicht einen effizienten Transport bei so niedrigen Konzentrationen wie 3 µg/ml, während für Polylysin Konzentrationen von > 25 µg/ml erforderlich waren, um eine signifikante Steigerung der Fluoreszenz zu bewirken (Fig. 15 d,e).

b) Um festzustellen, ob es für den Peptidtransport eine untere Grenze der Kettenlänge gibt, wurden Polyarginine verschiedener Kettenlänge (10-30 Reste) synthetisiert und auf ihre Fähigkeit untersucht, den Peptidtransport bei hohen Konzentrationen der Polykationen zu steigern (Fig. 17). Für diese Versuche wurde das Peptid LFEAIEGFI verwendet, die getesteten Polyargininpolymeren wurden in einer Konzentration von 100 pg/ml eingesetzt.

Eine, wenn auch geringfügige, Steigerung des Peptidtransports wurde bereits mit dem kürzesten getesteten Polyarginin beobachtet.

c) Basische Aminosäuren sind positiv geladene Moleküle. Man kann daher annehmen, dass negativ geladene Peptide über elektrostatische Wechselwirkungen an diese Polykationen binden könnten, was möglicherweise zu einer verstärkten Peptidaufnahme führt. Um diese Hypothese zu testen, wurde die

Fähigkeit kationischer Polyaminosäuren, kurze Peptide in Abhängigkeit ihrer Ladung in P388D1-Zellen aufzunehmen, verglichen. In nachstehender Tabelle sind die verwendeten negativ geladenen Peptide, die alle die für die MHC-I-Bindung erforderlichen Bedingungen erfüllen (Rammensee et al., 1995) aufgelistet. Peptid 1 ist vom Maus-TRP ("tyrosinase related protein") abgeleitet, Peptid 2 stammt vom Influenza-Hämagglutinin (Schmidt et al., 1996), Peptid 3 von Maus Tyrosinase, Peptid 4 vom P198-Tumorantigen, Peptid 5 von der beta Galaktosidase (Gavin et al., 1993). ("Mr" steht für Molekulargewichtsbereich, "fluor" steht für Fluoreszein).

Tabelle
EMI46.1

Sequenz	Mr	Mr	Ladung	Ladung	+	fluor
YAEDYEEL	1031	1389	4	x	negativ	6
LFEAIEGFI	1038	1396	2	x	negativ	4
IFMNGTMSQV	1127	1485	neutral	2	x	negativ
KYQAVTTTL	1024	1382	1	x	positiv	1
TPHPARIGL	961	1319	2	x	positiv	neutral

Aufgrund der zur Markierung des Peptids mit Fluoreszein verwendeten Methode werden zwei negative Ladungen eingeführt. Es zeigte sich, dass nach Inkubation mit Polyarginin die Peptide (5 nmol pro Probe) mit der höchsten Zahl an negativen Ladungen am effizientesten in P388D1-Zellen transportiert werden, was darauf hinweist, dass eine ionische Wechselwirkung zwischen Peptid und Polykation den Peptidtransport in Zellen noch weiter steigert (Fig. 18). Dennoch wurden im Vergleich zu Zellen, die mit Peptid allein behandelt wurden, auch im Fall neutraler Peptide in Gegenwart der Polykationen grössere Mengen aufgenommen. Die Behandlung mit Peptid allein resultierte bei allen getesteten Peptiden in beinahe identischen Fluoreszenzsignalen; aus Darstellungsgründen wird in Fig. 18 als "Peptid allein" stellvertretend das mit Peptid LFEAIEGFI erhaltene Fluoreszenzsignal gezeigt.

LITERATUR Alexander, J. et al., 1989, Immunogenetics 29, 380 Allrad, D.C. et al., 1992, J. Clin. Oncol. 10 (4), 599-605 Avrameas, A. et al., 1996, Eur. J. Immunol. 26, 394400 Behr, J.P., 1994, Bioconjug-Chem., Sept-Oct, 5(5), 382-9 Bertoletti, A. et al., 1994, Nature 369, 407-410 Biologic Therapy of Cancer, Editors: DeVita, V.T.Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Verlag J.B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, London, Hagerstown Blomberg, K. und Ulfstedt, A.C., 1993, J. Immunol. Methods 160:27-34 Boon, T., 1992, Adv Cancer Res 58, 177-210 Boon, T., 1993, Spektrum der Wissenschaft (Mai), 58-66 Boon, T. et al., 1994, Annu. Rev. Immunol. 12, 337-65 Boon, T. und van der Bruggen, P., 1996, J Exp Med 183, 725-729 Braciale, T.J. und Braciale, V.L., 1991, Immunol.

Today 12, 124-129 Brocke, S. et al., 1996, Nature 379 (6563), 343-346 Bronte, et al., 1995, J. Immunol. 154, 5282 Carrel, S. und Johnson, J.P., 1993, Current Opinion in Oncology 5, 383-389 Coligan, J.E., et 1991, Nature 351, 290-296 Coligan, J.E., et al., 1991, Current Prot. in Immunol., Wiley, New York Coulie, P.G. et al., 1992, Int. J. Cancer, 50, 289-297 Coulie, P. G. et al., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A 92, 7976-80 Coulie, P.G. et al., 1994, J. Exp. Med. 180, 35-42 Cox, A.L. et al., 1994, Science 264, 5159, 716-9 Current Protocols im Molecular Biology, 1995, Herausgeber: Ausubel F.M., et al., John Wiley & Sons, Inc.

Dranoff, G. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3539-3543 Dranoff, G. und Mulligan, R.C., 1995, Advances in Immunology 58, 417 Falk, K. et al., 1991, Nature 351, 290-296 Felgner, J.H. et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, 2550-2561 Feltkamp, M.C. et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25(9), 2638-2642 Fenton, R.G. et al., 1993, J. Natl. Cancer Inst. 85, 16, 1294-302 Fisk, B. et al., 1995, J. Exp. Med. 181, 2109-2117 Flow Cytometry, Acad. Press, Methods in Cell Biology, 1989, Vol. 33, Herausgeber: Darzynkiewicz, Z. und Crissman, H.A.

Gedde Dahl, T. et al., 1992, Hum Immunol. 33, 4, 266-74 Grohmann, U. et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25, 2797-2802 Guarini, A. et al., 1995, Cytokines and Molecular Therapy 1, 57-64 Han, X.K. et al., 1995, PNAS 92, 9747-9751 Handbuch: FACS Vantage TM User's Guide, April 1994, Becton Dickinson Handbuch: CELL Quest TM Software User's Guide, June 1994, Becton Dickinson Henderson, R. A., und Finn, O. J., 1996, Advances in Immunology 62, 217 - 256 Herin M. et al., 1987, Int. J. Cancer, 39, 390 Hock, H. et al., 1993, Cancer Research 53, 714-716 Houbiers, J. G., et al., 1993, Eur J Immunol 23, 2072-7.

Huang, A. Y. C., und Pardoll, D. M. (1996). Proc Natl Acad Sci U S A 93, 9730-5 Inaba, K., et al., 1992, J Exp Med 176, 1693-1702 Jung, S. et al., 1991, J. Exp. Med. 173, 1, 273-6 Kawakami, Y. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6458-62 Kawakami, Y. et al., 1994a, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9, 3515-9 Kawakami, Y. et al., 1994b, J. Exp. Med. 180, 1, 347-52 Kawakami, Y. et al., 1995, The Journal of Immunol. 154, 3961-3968 Kärre, K. et al., 1986, Nature 319, 20. Feb., 675 Kersh, G.J. et al., 1996, Nature 380 (6574), 495-498 Kovacsovics Bankowski, M. und Rock, K.L., 1995, Science 267, 243-246 Lanzavecchia, A., 1996, Curr. Opin. Immunol. 8, 348-354 Lehmann, J.M. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9891-9895 Lethe, B. et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22, 2283-2288 Li, H., et al., 1989, J Exp Med 169, 973-986 Lill, N. L., Tevethia, M. J., Hendrickson, W. G., und Tevethia, S. S. (1992). J Exp Med 176, 449-57 Ljunggren, H.G., et al., 1990, Nature 346:476-480 Loeffler, J.-P. et al., 1993, Methods Enzymol. 217, 599-618 Lopez, J.A., et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23, 217-223 MacBroom, C.R. et al., 1972, Meth. Enzymol. 28, 212-219 Mackiewicz, A. et al., 1995, Human Gene Therapy 6, 805-811 Malnati, M.S. et al., 1995, Science 267, 1016-1018 Mandelboim, O. et al., 1994, Nature 369, 5 May, 67-71 Mandelboim, O. et al., 1995, Nature Medicine 1, 11, 1179-1183 Marchand, M., et al., 1995, Int J of Cancer 63, 883-5 McIntyre, C.A., et al., 1996 Cancer Immunol. Immunother. 42:246-250.

Midoux, P., et al., 1993, NATO ASI Series H67, 49-64 Morishita, R. et al., 1993, J. Clin. Invest. 91, 6, 2580-5 Nabel, G.J. et 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11307-11311 Noguchi, Y. et 1994. Proc Natl Acad Sci US A 3171-3175 Oettgen, H.F. und Old, L.J., 1991, Biologic Therapy of Cancer, Editors: DeVita, V.T.Jr., Heilman, S., Rosenberg, S.A., Verlag J.B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, London, Hagerstown, 87-119 Ostrand-Rosenberg, S., 1994, Current Opinion in Immunology 6, 722-727 Pardoll, D.M., 1993, Immunology Today 14, 6, 310 Practical Immunology, Editors: Leslie Hudson and Frank C. Hay, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne Peace, D.J. et 1991, J. Immunol. 146, 6, 2059-65 Peoples, G.E. et al., 1994, J. Immunol. 152, 4993-9 Plautz, G.E. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4645-4649 Porgador, A., Gilboa, E., 1995, J. Exp. Med. 182, 255-260 Puccetti, P. et al., 1995, Eur. J. Immunol. 24, 1446-1452 Rammensee, H.G., et al., 1993, Annu Rev Immunol 11, 213-44 Rammensee, H.G. et al., 1993, Current Opinion in Immunology 5, 354-4 Rammensee, H.G., et al., 1995, Current Biology 7, 85-96 Rammensee, H.G., 1995, Current Opinion in Immunology 7, 85-96 Rammensee, H.G., et al., 1995, Immunogenetics 41, 178-228 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. Auflage 1990, Mack Publishing Company, Easton, Penn. 1990 Remy, J.S. et al., 1994, Bioconj-Chem., Nov-Dec, 5(6), 647-54 Rennie, J. und Rusting, R., 1996, Scientific American September, 28-30 Rivoltini, L. et al., 1995, The Journal of Immunology 154, 5 2257-2265 Robbins, P.F., et al., 1994, Cancer Res 54, 3124-6 Robbins, P. F., et al., 1995, J Immunol 154, 5944-50 Robbins, P.F. und Rosenberg, S.A., 1996, Journ. Exp. Med. 183, 1185-92.

Robbins, P.F. und Kawakami, Y., 1996, Curr Opin Immunol 8, 628-636 Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K. Immunology, Churchill Livingstone Rosenberg, S. A., 1996, Annual Reviews of Medicine, 47, 481 - 491
 Ryser, H.J. und Hancock, R., 1965, Science 150, 501-503 Ryser, H.J. und Shen, W.C., 1978, Proc Natl Acad Sci USA 75, 3867-3870 Schmidt, W., et al., May 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 4711-4714
 Schmidt, W., et al., 1996, Proc Natl Acad Sci USA, 93, 9759-63 Sette, A. et 1994, Mol. Immunol. 31(11):813-822, Shen, W.C. und Ryser, H.J., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1872-1876
 Shen, W.C. und Ryser, H.J., 1979, Mol. Pharmacol. 16, 614-622 Shen, W.C. und Ryser, H.J., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7589-7593
 Skipper, J., und Stauss, H.J., 1993, J. Exp. Med. 177, 5, 1493-8 Slingluff, C.L. et al., 1994, Current Opinion in Immunology 6, 733-740 Stein, D. et al., 1994, EMBO Journal, 13, 6, 1331-40 Stuber, G. et al., 1994, Eur. J. Immunol 24, 765-768 Sykuiev, Y. et al., 1994, Immunity 1, 15-22
 Theobald, M., Levine, A. J., und Sherman, L. A. (1995) PNAS 92, 11993-7 Tibbets, L.M. et al., 1993, Cancer, Jan. 15., Vol. 71, 2, 315-321 Tykocinski, M.L. et al., 1996, Am. J. Pathol. 148, 1-16 van der Bruggen, P. et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24, 9, 2134-40
 ISSN: 0014-2980 Van der Eynde, B. und Brichard, V.G., 1995, Current Opinion Immunol. 7, 674-81
 Van Pel, A. und Boon, T., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4718-4722 Van Pel, A., et al., 1995, Immunological Reviews 145, 229-250 Vitiello, A. et al., 1995, J. Clin. Inv. 95, 1, 341-349
 Wagner, E., et al., 1990, Proc Natl Acad Sci USA 87, 3410-4 Wagner, E., et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89, 6099-103
 Wang, R.F., et al., 1995, J Exp Med 181, 799-804 Weynants, P. et al., 1994, Int. J. Cancer 56, 826-829
 Widmann, C. et al., 1992, J. Immunol. Methods 155 (1), 95-99 Wölfel, T. et al., 1994 a), Int. J. Cancer 57, 413-418
 Wölfel, T. et al., 1994 b), Eur. J. Immunol. 24, 759-764 York, I.A. und Rock, K.L., 1996, Ann. Rev. Immunol. 14, 369-396
 Yoshino, I. et al., 1994 a), J. Immunol. 152, 5, 2393-400 Yoshino, I. et al., 1994 b), Cancer Res., 54, 13, 3387-90
 Young, J.W., Inaba, K., 1996, J. Exp. Med., 183, 7-11 Zatloukal, K. et al., 1993, Gene 135, 199-20
 Zatloukal, K. et al., 1995, J. Immunol. 154, 3406-3419

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

Claims of WO9730721

[Translate this text](#)

Patentansprüche 1) Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend mindestens ein immunmodulatorisch wirkendes Peptid, Protein oder Proteinfragment zusammen mit einem Adjuvans, dadurch gekennzeichnet, dass das

Adjuvans die Fähigkeit aufweist, die Bindung des Peptids bzw. des Proteins oder Proteinfragments an Zellen des zu behandelnden Individuums bzw. den Eintritt in die Zellen zu steigern und eine Verstärkung der immunmodulatorischen Wirkung des Peptids bzw. des Proteins oder Proteinfragments zu bewirken.

2) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid bzw. das zelluläre Abbauprodukt des Proteins oder Proteinfragments ein Ligand für mindestens ein MHC-Molekül ist, das von dem zu behandelnden Individuum exprimiert wird.

3) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid bzw. das zelluläre Abbauprodukt des Proteins oder Proteinfragments ein Ligand für ein MHC-I-Molekül ist.

- 4) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid bzw. das zelluläre Abbauprodukt des Proteins oder Proteinfragments ein Ligand für ein MHC-II-Molekül ist.
- 5) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Peptid enthält, das von einem Protein eines pathogenen Erregers abgeleitet ist.
- 6) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid von einem bakteriellen Protein abgeleitet ist.
- 7) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid von einem viralen Protein abgeleitet ist.
- 8) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Anwendung als Tumorstoff, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein ein Tumorstoff ist bzw. das Proteinfragment oder das Peptid bzw. die Peptide von Tumorstoff(en) abgeleitet sind.
- 9) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8 für die therapeutische Anwendung, dadurch gekennzeichnet, dass das bzw. die Tumorstoff(e) abgeleitet ist bzw. sind von Tumorstoffen, die von dem zu behandelnden Individuum exprimiert werden.
- 10) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 8 für die prophylaktische Anwendung, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumorstoffe abgeleitet sind von Vertretern häufig auftretender Tumorstoffe.
- 11) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das bzw. die Tumorstoff(e) Melanostoffe sind.
- 12) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie ausserdem ein Zytokin enthält.
- 13) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Zytokin ausgewählt ist aus der Gruppe IL-2, IL-4, IL-12, IFN- γ , IFN- β , IFN- α , IFN- ω , TNF- α , GM-CSF, oder Mischungen davon.
- 14) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie mehrere Peptide enthält, die sich dadurch unterscheiden, dass sie an unterschiedliche MHC-Subtypen des zu behandelnden Individuums binden.
- 15) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein oder mehrere Peptide enthält, die von einem natürlich vorkommenden immunogenen Protein oder Tumorstoff bzw. einem zellulären Abbauprodukt davon abgeleitet sind.
- 16) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein oder mehrere Peptide enthält, die verschieden sind von Peptiden, die von natürlich vorkommenden immunogenen Protein(en) oder Tumorstoff(en) bzw.

eine zellulären Abbauprodukt(en) davon abgeleitet sind.

17) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid ein Antagonist eines Peptids ist, das von einem Protein abgeleitet ist, das eine Autoimmunerkrankung verursacht.

18) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Adjuvans ein organisches Polykation oder eine Mischung organischer Polykationen ist.

19) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid negativ geladen ist.

20) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Adjuvans eine basische Polyaminosäure oder eine Mischung basischer Polyaminosäuren ist.

21) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Adjuvans Polyarginin ist.

22) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Adjuvans Polylysin ist.

23) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Adjuvans mit einem zellulären Liganden konjugiert ist.

24) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand ein Kohlenhydratrest ist.

25) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand Fukose ist.

26) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand Transferrin ist.

27) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass sie ausserdem DNA enthält, die frei ist von Sequenzen, die für funktionelle Proteine kodieren.

28) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass sie ausserdem DNA enthält, die für ein immunmodulatorisches Protein kodiert.

29) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass das immunmodulatorische Protein ein Zytokin aus der Gruppe IL-2, IL-4, IL-12, IFN-a, IFN-D, IFN-r, IFN-o, TNF-a, GM-CSF ist.

30) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 29 für die parenterale Verabreichung.

31) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass sie als Lösung

oder Suspension des Peptids und des Adjuvans in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger vorliegt.

32) Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 29 für die topische Verabreichung.

33) Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 32 in Form eines Hydrogels.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide